

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE DO EFEITO DE UM EXTRATO COMBINADO DE
ANDIROBA, COPAÍBA E GUARANÁ EM MODELOS DE CICATRIZAÇÃO *IN VITRO*
E *IN VIVO*

EULER ESTEVES RIBEIRO FILHO

Manaus

2019

EULER ESTEVES RIBEIRO FILHO

DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE DO EFEITO DE UM EXTRATO COMBINADO DE
ANDIROBA, COPAÍBA E GUARANÁ EM MODELOS DE CICATRIZAÇÃO *IN VITRO*
E *IN VIVO*

Trabalho de Conclusão de Mestrado Profissional
apresentado à Universidade Federal do Amazonas
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Cirurgia para a obtenção do título de
Mestre em Cirurgia, na área de concentração
Cirurgia Experimental e Minimamente Invasiva.

Orientador: Prof. Dr. Juscimar Carneiro Nunes

Coorientadora: Profa. Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Manaus
2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Ribeiro Filho, Euler Esteves
R484d Desenvolvimento e análise do efeito de um extrato combinado de andiroba, copaíba e guaraná em modelo de cicatrização in vitro e in vivo / Euler Esteves Ribeiro Filho . 2019
84 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Juscimar Carneiro Nunes
Coorientadora: Ivana Beatrice Mânica da Cruz
Dissertação (Mestrado Profissional em Cirurgia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Pele. 2. Cirurgia. 3. Cicatrização. 4. Inflamação. I. Nunes, Juscimar Carneiro. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

EULER ESTEVES RIBEIRO FILHO

**DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE DO EFEITO DE UM EXTRATO
COMBINADO DE ANDIROBA, COPAÍBA E GUARANÁ EM MODELOS DE
CICATRIZAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO***

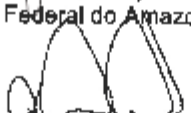
Trabalho de Conclusão de Mestrado Profissional defendido junto à Universidade Federal do Amazonas como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia - Mestrado Profissional, na área de concentração Cirurgia Experimental e Minimamente Invasiva para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Aprovado em oito de agosto de dois mil e dezanove.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Juscimar Carneiro Nunes – Presidente
Universidade Federal do Amazonas – PPGRACI


Prof. Dr. Jonas Byk – Membro
Universidade Federal do Amazonas – PPGRACI


Prof. Dr. Cleinaldo de Almeida Costa – Membro
Universidade do Estado do Amazonas - UEA

Todos os meus sonhos são movidos por motivação, perseverança e exemplos inspiradores, tirados do meu berço de origem, Euler e Ednéa Ribeiro meus pais, da minha companheira de todos os momentos, Juliana Maria Brandão Ozores Ribeiro e do meu convívio familiar como pai, aprendendo todos os dias com meus filhos, o verdadeiro significado da palavra esperança. Obrigado João Victor Neves dos Santos Ribeiro, Lara Ozores de Souza, Lucca Neves dos Santos Ribeiro e Euler Esteves Ribeiro Neto.

AGRADECIMENTOS

A presente dissertação de mestrado não poderia ser concluída com êxito sem o precioso apoio de várias pessoas.

Em primeiro lugar, não posso deixar de agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Juscimar Carneiro Nunes e à minha Coorientadora Professora Doutora Ivana Beatrice Manica da Cruz, por toda a paciência, empenho e sentido prático com que sempre me orientaram neste trabalho e em todos aqueles que realizei durante os seminários do mestrado. Muito obrigada por me ter corrigido quando necessário sem nunca me desmotivar.

Lembrar de todos os componentes do Laboratório de Genômica da Universidade Federal de Santa Maria na pessoa da Professora Doutora Fernanda Barbisan.

Desejo igualmente agradecer a todos os meus colegas do Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, cujo apoio e amizade estiveram presentes em todos os momentos.

Por último, quero agradecer à minha família e amigos pelo apoio incondicional que me deram, especialmente a minha esposa Juliana Maria Brandão Ozores Ribeiro, entendendo a importância desse momento de vida acadêmica.

Aos meus filhos, João Victor Neves dos Santos Ribeiro, Lara Ozores de Souza, Lucca Neves dos Santos Ribeiro e Euler Esteves Ribeiro Neto, respeitando meus limites de tempo pra com eles.

Agradecer aos meus pais, Euler Esteves Ribeiro e Ednéa Aguiar Maia Ribeiro pelo incentivo absoluto a todos os meus projetos, em especial ao de Mestrado, tão importante nesse meio acadêmico de crescimento intelectual.

RESUMO

JUSTIFICATIVA: A pele é o maior órgão do corpo humano e tem como funções revestir, delimitar, proteger e interagir com o meio exterior. Assim, a cicatrização da pele é um elemento fundamental para a saúde humana, tanto na ocorrência de lesões quanto em procedimentos cirúrgicos. A eficácia do processo de cicatrização pode ainda ser aprimorada através do desenvolvimento de produtos que tenham origem em plantas com uso tradicional, esta importância é potencializada quando levamos em consideração que o Brasil é um país megadiverso, sendo a região Amazônica o grande celeiro desta diversidade. Assim, neste estudo buscamos desenvolver um composto pró cicatrização a base dos óleos de andiroba (*Carapa guianensis*), copaíba (*Copaifera langsdorffii*) e do pó de Guaraná (*Paullinia Cupana*), três plantas de origem amazônica que possuem potencial efeito cicatrizante via modulação da fase inflamatória e proliferativa de fibroblastos. É possível que a combinação dos óleos e guaraná resulte em um potencial produto farmacológico inovador, com alto potencial pró-cicatrizal. **OBJETIVOS:** **Geral:** Desenvolver e Analisar o efeito de um produto obtido via extração combinada de andiroba, copaíba e guaraná (ACG) sob a forma de óleo bifásico e emulsão através da análise de modelos de cicatrização *in vitro* e *in vivo*. **Específicos:** Realizar as análises utilizando fibroblastos dérmicos e minhoca californiana *Eisenia fetida*, modelo *in vivo* de regeneração corporal via incisão cirúrgica da região caudal. **MÉTODO:** Por se tratar de um estudo que não envolve contato direto com vertebrados, não houve necessidade de aprovação em Comitê de ética. Após a obtenção do ACG a capacidade antioxidante e genotóxica/ genoprotetora foi avaliada em testes não celulares. Para os testes utilizando-se a linhagem comercial de fibroblastos dérmicos HFF-1 e minhocas californianas (*Eisenia Fetida*), também obtidas comercialmente. As células foram cultivadas em condições padronizadas, e nestas foi realizado o teste *strach* assay (modelo *in vitro* de lesão na pele) as células foram tratadas com o ACG em diferentes concentrações e após incubação de 24/72 horas, testes de viabilidade/ proliferação celular marcadores de crescimento, estresse oxidativo e inflamação foram analisados. No modelo *in vivo*, os animais tiveram uma incisão caudal foram imediatamente tratados com ACG sob a forma de óleo e emulsão, após 24 horas foi analisada a expressão gênica e após 7 dias fez se a análise dos padrões de regeneração. A análise estatística foi realizada por análise de variância de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey. Sendo considerados significativos testes com $p \leq 0.05$. **RESULTADOS:** Como resultados do estudo o ACG demonstrou forte atividade antioxidante, e não foi genotóxico nos testes aqui realizados. Frente aos modelos celulares apresentou ação antioxidante, anti-inflamatória e pró-cicatrizal. Nos testes *in vivo* foi capaz de modular positivamente o gene SOX-4 totalmente relacionado ao processo de regeneração/ cicatrização, ainda na presença do óleo ACG o processo de regeneração se deu de maneira mais intensa inclusive com melhor angiogenese. **CONCLUSÕES:** Assim, apesar das limitações metodológicas, consideramos relevantes os dados obtidos neste estudo uma vez que foi desenvolvido um novo produto aqui denominado ACG, cujo os resultados iniciais mostram ação antioxidante, anti-inflamatória e pró-cicatrização do composto desenvolvido, mais estudos precisam ser realizados para comprovação dos resultados aqui obtidos, entretanto acreditamos que futuramente o desenvolvimento de um produto comercial com fins clínicos poderá ser uma realidade.

DESCRIPTORIOS: Pele; Cirurgia; Cicatrização; Inflamação; Proliferação celular.

ABSTRACT

BACKGROUND: The skin is the largest organ of the human body and its functions are to coat, delimit, protect and interact with the external environment. Thus, skin healing is a fundamental element for human health, both in the occurrence of injuries and in surgical procedures. The effectiveness of the healing process can be further enhanced through the development of products that originate from plants with traditional use, this importance is enhanced when we consider that p Brazil is a megadiverse country, being the Amazon region the great granary of this diversity. Thus, in this study we sought to develop a healing compound based on andiroba (*Carapa guianensis*), copaíba (*Copaifera langsdorffii*) and Guarana (*Paullinia Cupana*) oils, three plants of Amazonian origin that have potential healing effect via phase modulation inflammatory and proliferative fibroblasts. It is possible that the combination of oils and guarana will result in a potential innovative pharmacological product with high pro-healing potential. **OBJECTIVES: General:** Develop and analyze the effect of a product obtained via combined extraction of andiroba, copaiba and guarana (ACG) in the form of biphasic oil and emulsion through the analysis of *in vitro* and in vivo healing models. **Specific:** Perform the analysis using dermal fibroblasts and Californian worm *Eisenia fetida*, in vivo model of body regeneration via surgical incision of the caudal region. **METHOD:** Because it is a study that does not involve direct contact with vertebrates, there is no need for approval by the Ethics Committee. After obtaining the ACG the antioxidant and genotoxic / genoprotective capacity was evaluated in non-cellular tests. For the tests using the commercially derived dermal fibroblast line HFF-1 and Californian worms (*Eisenia Fetida*), also commercially obtained. The cells were cultured under standard conditions, and in these strach assay (*in vitro* skin lesion model) tests were performed. The cells were treated with ACG at different concentrations and after 24/72 hour inclination, viability tests / cell proliferation. Growth markers, oxidative stress and inflammation were analyzed. In the in vivo model, the animals had a caudal incision were immediately treated with ACG in the form of oil and emulsion, after 24 hours gene expression was analyzed and after 7 days regeneration patterns were analyzed. Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance followed by Tukey post hoc test. Considering significant tests with $p < 0.05$. **RESULTS:** As a result of the study, ACG demonstrated strong antioxidant activity, and was not genotoxic in the tests performed here. In front of the cellular models presented antioxidant action, anti-inflammatory and pro-cicatricial. In in vivo tests it was able to positively modulate the SOX-4 gene totally related to the regeneration / healing process, even in the presence of ACG oil the regeneration process was more intense even with better angiogenesis. **CONCLUSIONS:** Thus, despite the methodological limitations, we consider the data obtained in this study to be relevant since a new product called ACG was developed here, whose initial results show antioxidant action, anti-inflammatory and pro-healing of the developed compound, more studies need to be performed. To prove the results obtained here, however, we believe that in the future the development of a commercial product for clinical purposes may be a reality.

KEYWORDS: Skin; Surgery; Healing; Inflammation; Cell proliferation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura Geral da Pele Humana.....	11
Figura 2- Fibroblastos e Queratinócitos em contraste de fase.....	12
Figura 3- Representação Esquemática do Processo cicatricial.....	13
Figura 4- Visualização da árvore e do fruto da andiroba (<i>Carapa guianensis</i> , <i>Meliaceae</i>).	20
Figura 5- Visualização da árvore e dos frutos da copaiba (<i>Copaifera langsdorffii</i> , Desf).	24
Figura 6- Método do arranhão (<i>stretch assay</i>) em cultura de fibroblastos.....	36
Figura 7- Síntese de aspectos filogenéticos e características gerais da anatomia externa da minhoca.....	40
Figura 8- Corte transversal da minhoca.....	41
Figura 9- Esquema geral da anatomia interna da minhoca.....	42
Figura 10- Esquema geral da relação entre segmentos corporais externos e principais órgãos internos da minhoca.....	43
Figura 11- Cultivo Celular de Fibroblasto	49
Figura 12- Processo de tratamento das minhocas.....	52
Figura 13- Características morfológicas analisadas e comparadas entre minhocas submetidas à incisão cirúrgica caudal.....	54
Figura 14- Capacidade antioxidante do ACG, analisada via teste DPPH.....	58
Figura 15- Análise da migração de fibroblastos utilizando o ensaio <i>in vitro</i>	59
Figura 16- Marcadores proliferativos FGF (Fator de Crescimento de Fibroblastos) e de KGF (Fator de Crescimento de Queratinócitos).....	60
Figura 17- Níveis das enzimas antioxidantes Superoxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPX).	61
Figura 18- Níveis de Espécies Reativas de Oxigênio	62
Figura 19- Marcadores do metabolismo inflamatório dos fibroblastos HFF1	63
Figura 20- Principais etapas da incisão cirúrgica em minhocas	64
Figura 21- Comparação das áreas regeneradas.....	66
Figura 22- Representação das principais alterações observadas em minhocas submetidas à incisão cirúrgica da região posterior (anal) e tratadas com emulsão (com e sem o produto ACG).	67
Figura 23- Microfotografia do celoma extrudado de minhoca destacando a presença de um corpo marrom	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Síntese das principais moléculas bioativas identificadas em extratos de semente andiroba obtidos com diferentes solventes e no óleo prensado	21
Tabela 2- Síntese das principais condutas terapêuticas convencionais em alterações cicatriciais cirúrgicas.....	30
Tabela 3- Síntese de patentes contendo andiroba e copaíba, identificadas a partir da busca na base de dados do Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) e em bases internacionais de patentes	34

SUMÁRIO

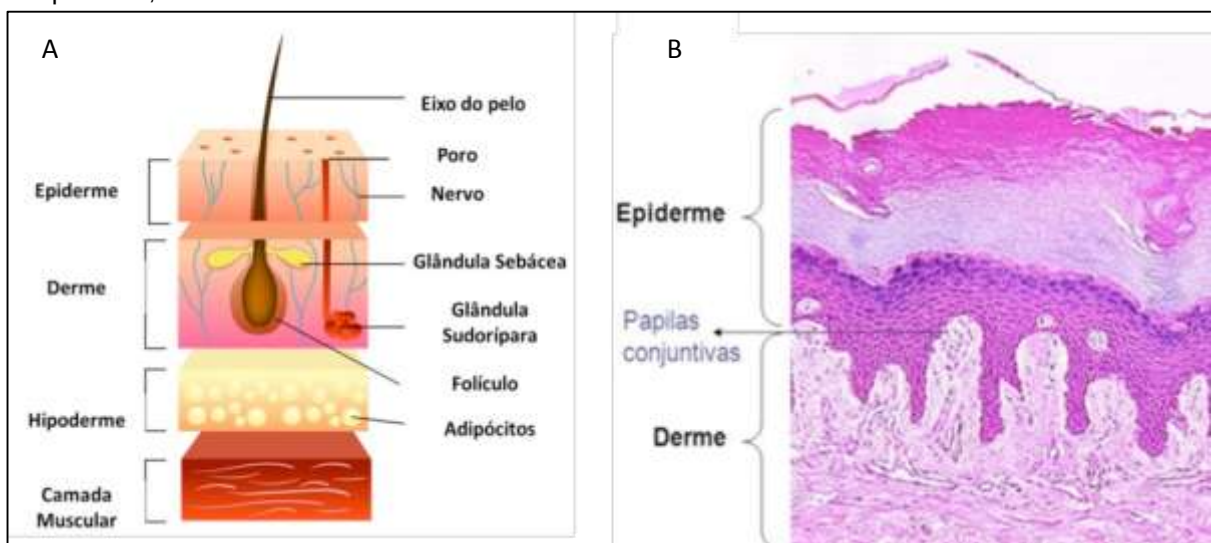
1 INTRODUÇÃO	11
1.2 Dinâmica do processo cicatricial da pele	12
1.2.1 Fase Inflamatória da cicatrização	14
1.2.2 Angiogênese, Migração e Proliferação de Fibroblastos.....	16
1.2.3 Formação da Cicatriz e Remodelamento Tecidual.....	17
1.3 Potencial uso de extratos amazônicos na cicatrização	18
1.3.1 Potencial cicatrizante da Andiroba.....	19
1.4 Potencial cicatrizante da Copaíba.....	23
1.5 Potencial do Guaraná na qualidade do processo cicatricial	25
1.6 Potencial desenvolvimento de produtos cicatrizantes aplicáveis à cirurgia estética baseados na Andiroba, Copaíba e Guaraná.....	27
1.7 Modelo experimental <i>in vitro</i> de fibroblastos.....	35
1.8 Minhocas californianas como modelo de cicatrização e regeneração	37
2 OBJETIVOS	46
2.1 Objetivo Geral.....	46
2.2 Objetivos Específicos	46
3 MÉTODO	47
3.1 Delineamento do estudo	47
3.2 Caracterização do Produto ACG.....	47
3.5 Protocolos <i>in vitro</i> com fibroblastos.....	49
4. RESULTADOS.....	58
4.1 Caracterização do extrato bifásico ACG	58
5 DISCUSSÃO	68
6 CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 A pele

A pele é o maior órgão do corpo, sendo composta por duas camadas principais, epiderme e derme, em associação a hipoderme que é representada por uma camada subcutânea que contém tecido adiposo, abaixo da camada adiposa encontram-se os músculos e então, ossos (Figura 1) (KEDE e SABATOVICH, 2004).

Figura 1: Estrutura Geral da Pele Humana. A- Representação da pele e anexos; B- Visão histológica da epiderme, membrana basal e derme.



Fonte: Figura elaborada pelo autor desta dissertação a partir de figuras disponíveis no Google imagens e Atlas Digital de Histologia Básica Universidade Estadual de Londrina (UEL) - 2014.

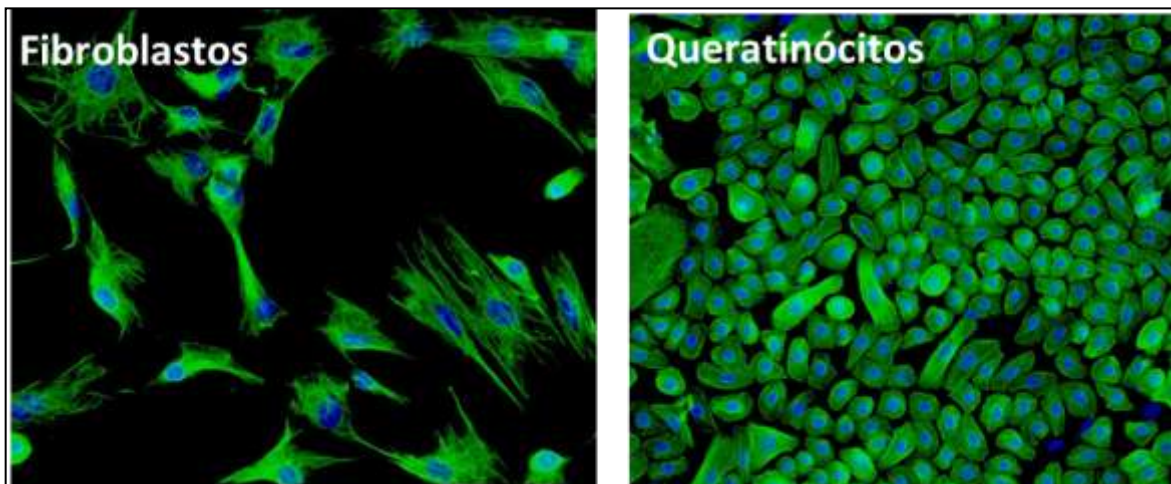
A camada epidérmica é avascular, histologicamente constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, caracterizada pela presença de diversas células, como: queratinócitos, melananócitos, células do sistema imune (macrófagos, células de Langerhans e plasmócitos). Têm-se ainda as células relacionadas à função sensorial da pele, as chamadas células de Merkel (RAMOS - SILVA, e CASTRO, 2010). As células da epiderme têm a propriedade de se renovar, devido à alta função mitótica da membrana basal, que fica em contato direto com a derme, assim conforme novas células vão sendo produzidas/ amadurecidas estas migram da camada mais profunda para a camada mais superficial (KEDE e SABATOVICH, 2004).

Já a derme, é uma camada altamente vascularizada e innervada, é constituída por tecido conjuntivo, produzido pelos fibroblastos, macrófagos, leucócitos e terminações nervosas. A derme está intimamente relacionada à manutenção da homeostase do organismo vivo, uma vez que está diretamente relacionada à

regulação da temperatura, sensibilidade à dor e pressão, hidratação e síntese de vitamina D. Além disto, é considerada a barreira protetora contra produtos químicos e patógenos externos. Por este motivo, o dano a qualquer parte da pele leva ao desenvolvimento de feridas que podem comprometer a saúde (HO et al., 2017).

Levando em consideração o órgão pele, as principais células que a compõem são os queratinócitos e fibroblastos (Figura 2). Os queratinócitos estão presentes em aproximadamente 80% da epiderme. Estas células responsáveis pela formação do epitélio estratificado pavimentoso, queratinócitos são assim chamados por produzirem a proteína queratina, que confere proteção. Já os fibroblastos, localizados na derme, são células de formato estrelado, com prolongamentos citoplasmáticos que tem como principal função a síntese de colágeno, elastina, ácido hialurônico e ainda, desempenham um papel fundamental na expressão de componentes da membrana basal, produzem laminina e influenciam os queratinócitos na formação da membrana basal (GOLUBTSOVA et al., 2016). O fibroblasto também pode ser capaz de sintetizar fatores de crescimento para a diferenciação e proliferação celular, sendo uma célula chave no processo cicatricial da pele (CLARK et al., 2007).

Figura 2: Fibroblastos e Queratinócitos em contraste de fase. Visualização por microscópio de fluorescência.



Fonte: Figura criada pelo autor dessa dissertação, a partir de imagens obtidas no 3H Biomedical. Disponível em: < <https://www.3hbiomedical.com> >.

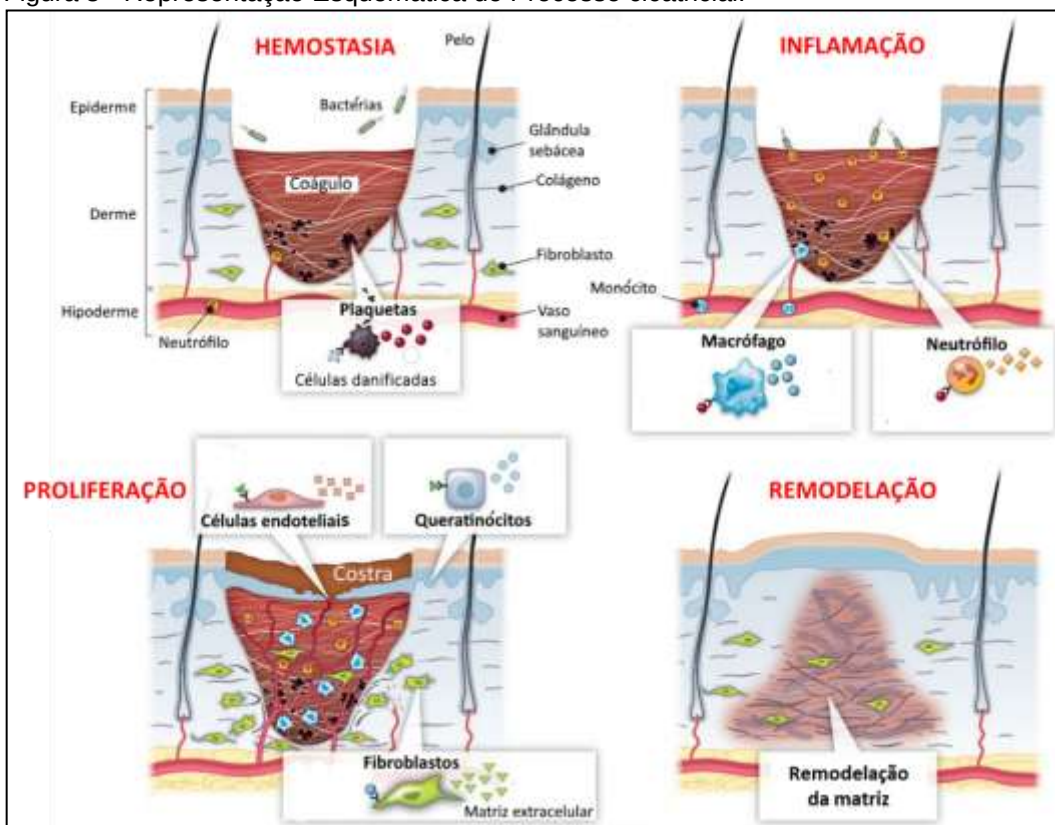
1.2 Dinâmica do processo cicatricial da pele

O Brasil é um dos países que mais realiza cirurgias plásticas, sendo a da mama o procedimento mais frequentemente realizado pelas mulheres saudáveis (redução,

aumento ou levantamento das mamas) ou por mulheres portadoras de câncer de mama (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA ESTÉTICA, 2015). Com certeza o principal elemento crítico e complicador da cirurgia estética, relaciona-se a cicatrização. Quando este processo sofre alterações do padrão esperado, pode gerar problemas estéticos não desejados no local da cicatriz (JOYCE et al., 2015). Apesar dos avanços da área, existe a necessidade de desenvolver estratégias complementares que melhorem a qualidade da regeneração tecidual e minimizem assim, as complicações relacionadas aos processos cicatriciais (HO et al., 2017).

A cicatrização de feridas na pele é um processo dinâmico e complexo, coordenada por uma cascata de eventos celulares, moleculares e bioquímicos que interagem e determinam a reconstituição do tecido. A sequência ordenada de eventos cicatrizais foi descrita há mais de um século por Carrel, sendo subsequentemente dividida em cinco etapas: (1) inflamação; (2) angiogênese; (3) migração e proliferação de fibroblastos; (4) formação da cicatriz e (5) remodelamento (BROUGHTON et al., 2006; HO et al., 2017). A Figura 3 apresenta uma representação esquemática do processo cicatricial.

Figura 3 - Representação Esquemática do Processo cicatricial.



Fonte: Teixeira et al., 2018

1.2.1 Fase Inflamatória da cicatrização

Em geral qualquer processo inflamatório do organismo possui duas fases complementares, onde a primeira visa limpar a área lesionada de restos celulares e outros resíduos ocasionados pelo trauma do corte via resposta próinflamatória dos macrófagos M1 residentes no tecido conjuntivo, e de outras células imunes recrutadas para o local lesionado. Nesta fase, os macrófagos M1 passam a produzir uma cascata de citocinas pró- inflamatórias como a interleucina (IL) 1 β , IL-6 e Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α). Esta fase está associada ao aparecimento dos sintomas clínicos da inflamação que incluem edema, dor e calor e na região lesada. Este processo estimula a transformação dos macrófagos M1 em macrófagos M2, que passam a ter atividade anti-inflamatória via produção de citocinas como a IL-10. Esta segunda fase inibe a produção das citocinas pró-inflamatórias e estimula a regeneração do tecido lesado (WERNER E GROSSE, 2003; SUNDERKOTTER et al., 2004; DELAVARY et al., 2011; MINUTTI et al., 2016). Na pele lesada, estes processos estarão também presentes e serão de vital importância para a sua cicatrização.

Durante a primeira etapa da lesão, os queratinócitos reagem ao dano celular. A hemostasia é alcançada por vasoconstricção endotelial ativada e pela produção de uma cascata de coagulação (BROUGHTON et al., 2006). As plaquetas têm um papel de grande relevância na cicatrização, já que além de participarem da cascata coagulatória liberam para o meio diversas moléculas sinalizadoras, como o fator de crescimento de transformação beta (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDFF), fator de crescimento derivado de fibroblastos (FGF), fator de crescimento dérmico (EFF), prostaglandinas e tromboxanos (BROUGHTON et al., 2006, HO et al., 2017). Estas moléculas se difundem e agem no local lesionado, aumentando a vasodilatação, a permeabilidade vascular e promovendo a recrutamento para o local de células do sistema imune, com destaque aos neutrófilos e macrófagos.

Os neutrófilos atuam diretamente na limpeza do tecido lesado via fagocitose. No caso, a regulação da diferenciação dos monócitos em macrófagos envolve o TGF- β . Estes eventos são vitais para o desencadeamento da resposta inflamatória local. Estas células são as primeiras a chegarem à região lesada, através do fenômeno da diapedese, onde se inicia a inflamação. Portanto, são os tipos celulares predominantes no primeiro e segundo dias. Após cessar a migração destas células,

estas permanecem localizadas difusamente no coágulo formado (BROUGHTON et al., 2006, ZIEGLER et al., 2012).

O segundo tipo de célula imune que chega ao local da lesão, são os macrófagos formados a partir da diferenciação dos monócitos circulantes no sangue. Estes começam a atuar entre o 2º e 5º dia, e ao contrário dos neutrófilos são elementos celulares críticos no processo de reparo tecidual (DI PIETRO, 1995). Os macrófagos estão praticamente presentes durante todas as etapas do processo de reparação e a depleção condicional durante as diferentes fases da cicatrização de feridas, ressaltando que os macrófagos cumprem funções funcionais distintas, enfatizando a grande diversidade e plasticidade destas células no processo cicatricial (MINUTTI et al., 2016). Além dos macrófagos derivados de monócitos, dois tipos de populações de macrófagos residem na pele e também atuam na cicatrização: As células de Langerhans (células dendríticas), que estão localizadas principalmente na camada epidérmica e os macrófagos residentes na derme. Entretanto, o papel das células de Langerhans ainda não está totalmente esclarecido (MINUTTI et al., 2016).

Na lesão, as células danificadas liberam cálcio, que atuam nos macrófagos residentes ativando a enzima Dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADP oxidase), que por sua vez, produz níveis elevados de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O cálcio e o H_2O_2 mobilizam células epiteliais e imunes para o local da ferida. Nos monócitos, o aumento de H_2O_2 ativa a liberação da proteína HMGB-1 (*do inglês, high-mobility group Box 1 protein*). A HMGB-1 e moléculas como a adenina trifosfato (ATP) ativam a resposta inflamatória não-microbiana associada a lesões teciduais, sendo em conjunto conhecidas como moléculas DAMPS (*do inglês, danger-associated molecular, patterns*). Quando uma célula se rompe, o ATP acaba sendo liberado para o meio extracelular, sendo rapidamente reconhecido por receptores celulares purinérgicos (P2Y e P2X) presentes na membrana dos macrófagos, residentes na derme. Esta ligação atrai estes macrófagos para o local lesionado e fazendo com que os mesmos liberem citocinas pró- inflamatórias armazenadas no citoplasma sob uma forma inativa. Estas incluem, por exemplo, a IL-1 β e a IL-6. Logo a seguir ocorre a produção do TNF- α (MINUTTI et al., 2016; WYNN E VANNELLA, 2016; HO et al., 2017).

Estas citocinas - principalmente IL-1 e TNF α - produzidas principalmente por macrófagos induzem a vasodilatação que age a fim de lentificar a circulação sanguínea, diminuindo sua força de arraste, e auxiliando o ingresso de contingentes

de células imunes do sangue para a lesão. A produção do TNF- α , atua na amplificação maior da resposta inflamatória e na formação de tecido de granulação (WYNN E VANNELLA, 2016).

1.2.2 Angiogênese, Migração e Proliferação de Fibroblastos

O acúmulo de células como neutrófilos e a ativação dos macrófagos no local lesado, diminui o aporte de oxigênio e nutrição no local. Esta condição acaba aumentando a hipóxia, e consequentemente as concentrações de ácido láctico levando a diminuição do pH tecidual. Esta combinação atua nos macrófagos induzindo estas células a produzirem fatores de crescimento. Novamente aqui, os macrófagos possuem papel fundamental no processo. Na continuidade da cicatrização, ocorre a chamada fase proliferativa que tem uma duração máxima de 14 dias.

Esta fase abrange múltiplos processos como a angiogênese, epitelização, formação do tecido de granulação e deposição de colágeno. Assim, a proliferação celular junto com a angiogênese são processos que devem ocorrer sendo estimulados pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de FGF (MINUTTI et al., 2016; HO et al., 2017).

Os fibroblastos são predominantes nos estágios iniciais da cicatrização e alguns se transformam em miofibroblastos, que são responsáveis pela contração da ferida. Os fibroblastos secretam componentes da matriz extracelular, que formam as bases para o reparo da pele (TRACY et al., 2016). O processo de re-epitelização com proliferação e migração de células epiteliais começa cedo após a lesão, e continua na fase de remodelação. O aumento da atividade fibroblástica resulta na produção e depósito de colágeno tipo III, que inicialmente pode representar 30% do colágeno cicatricial da ferida. Gradualmente, o colágeno III é substituído por colágeno de tipo I e na segunda semana, a produção de tipo I passa a ser predominante. Tanto o colágeno tipo I quanto o III são produzidos durante a cicatrização de feridas, mas é a proporção de sua produção que determina a proporção de colágeno. O acúmulo líquido de colágeno atinge seu ápice na terceira semana após a ocorrência da lesão. Durante o restante do estágio de remodelação, taxas elevadas de colágeno são produzidas, sem que haja um aumento global de líquido. Este processo ocorre porque

a taxa de produção e degradação de colágeno chega a um equilíbrio (MADDEN E PEACOCK, 1968; HO et al., 2017).

Com a migração e proliferação dos fibroblastos começa a se formar o tecido de granulação por volta do 4º dia (GUIDUGLI-NETO, 1987), composto por macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados que são mantidos por uma matriz extracelular frouxa, formada principalmente por fibronectina, ácido hialurônico e colágenos do tipo I e II. O aspecto deste tecido é edemaciado devido à presença de enormes espaços vazios, já que os vasos sanguíneos são ainda imaturos, muito exudativos e sangram facilmente. Esta etapa da cicatrização é um processo essencial porque irá permitir a nutrição e a troca gasosa adequada das células ativas (EMING et al., 2014; HO et al., 2017).

1.2.3 Formação da Cicatriz e Remodelamento Tecidual

O leito de uma ferida aberta precisa ser preenchido, e este processo ocorre a partir de dois mecanismos diferentes e complementares. O primeiro envolve a natureza anatômica da ferida que irá proporcionar estímulos que levam a migração e proliferação das células para o local (fibroblastos, queratinócitos) a partir das margens teciduais não lesadas. Este fenômeno é conhecido como “efeitos de vizinhança” (MONTESANO E ORCI, 1988). O segundo envolve o movimento das margens da ferida, uma em direção a outra como se sofressem uma tração invisível (PEACOCK, 1984). É relevante salientar que a superfície da ferida, como está oxigenada e bem umedecida acelera o processo de migração das células epiteliais para o centro da ferida. Quando as células epiteliais encontram a crosta da ferida, ocorre um retardo na sua velocidade de migração sendo acionado um mecanismo conhecido como “inibição por contato”, e as células voltam a apresentar um padrão citológico original. No final desta fase, o leito da ferida já está totalmente preenchido pelo tecido de granulação, a circulação já foi reestabelecida pela angiogênese e a rede linfática começa também a se regenerar. De modo lento, o tecido de granulação é enriquecido com maior quantidade de fibras colágenas o que fornece a aparência da cicatriz da região lesada em consequência do acúmulo de massa fibrosa no local (MINUTTI et al., 2016; HO et al., 2017). É importante salientar que reparação é o fechamento de

feridas com formação de cicatrizes e, regeneração é o fechamento perfeito dos tecidos danificados, sem cicatrizes.

1.3 Potencial uso de extratos amazônicos na cicatrização

O uso de plantas medicinais para tratar aspectos relacionados à saúde e estética humana é relatado há milênios na medicina tradicional distribuídos por todo o mundo, como é o caso da medicina chinesa e tibetana. Atualmente, estima-se que 25% de todos os fármacos tradicionais são derivados direta ou indiretamente de plantas medicinais. Com a inclusão de certas classes de produtos farmacêuticos, como fármacos antitumorais e antimicrobianos, essa percentagem pode ser maior que 60% (WHO, 2012; HAYTA et al, 2014).

Um número expressivo de espécies de plantas representa uma fonte de moléculas com amplo potencial em aplicações farmacológicas. Tais plantas, não só possuem constituinte, como também, são usados diretamente como agentes terapêuticos, e ainda, como matérias-primas para a síntese, ou modelos para compostos farmacologicamente ativos. Assim, atualmente, fármacos naturais, são considerados uma das maiores fontes de medicamentos já aprovados no Brasil e no Mundo (BRASIL, 2016; SOUZA-MOREIRA; QUEIROZ FERNANDES; PIETRO, 2018).

Entretanto, é importante que sejam realizadas pesquisas em todas as suas fases para que o uso destas plantas com efeito cicatrizante possa ser feito a partir dos pressupostos da medicina baseada em evidências (MABONA E VUUREN, 2013). Portanto, pesquisar o potencial de fármacos à base de plantas é uma emergência e uma responsabilidade desafiadora, que é indispensável no desenvolvimento de novas tecnologias relacionadas ao cuidado das lesões cutâneas (AMIRKIA E HEINRICH, 2015; URIMNALA et al., 2017).

Nos processos cirúrgicos as células lesionadas são de fato substituídas pelo tecido cicatricial, que é composto por fibras de colágeno. Estratégias terapêuticas para minimizar estas complicações têm sido investigadas, principalmente aquelas que aumentam a produção do ácido hialurônico (AH), hidratam e são anti-inflamatórias (WEN et al., 2010; OWUANG et al., 2011; PARK et al., 2015; TITO et al., 2015; MAHEDIA et al., 2016). Este processo pode acabar ocorrendo de modo desorganizado produzindo ondulações, depressões, repuxamentos associados a complicações pós-cirúrgicas importantes, incluindo formação de hematoma, seroma,

retardo na cicatrização do corte, perda na sensibilidade do mamilo, isquemia ou necrose, hipertrofia entre outros (BARR et al., 2016; HAMMOND E KIM, 2016; MISANI E DE MAY, 2016; SHESTAK E DAVIDSON, 2016).

Existem muitos extratos de plantas que possuem potencial uso em processos de cicatrização, principalmente oriundos de espécies nativas da Amazônia (DE VARGAS et al., 2016) que são utilizados na medicina tradicional com o objetivo de estimular a cicatrização de feridas. Entretanto, estudos sobre o potencial uso de certos extratos combinados na cicatrização cirúrgica são ainda bastante incipientes. Tais estudos são relevantes porque apresentam um potencial elemento de inovação tanto na área da cirurgia veterinária quanto humana. Três plantas podem ser destacadas: a andiroba (*Carapa guianensis*, Meliaceae) e a copaíba (*Copaifera langsdorffii*) e o guaraná (*Paullinia cupana*, Sapindaceae). Os óleos destas duas primeiras plantas são utilizados na medicina tradicional amazônica por suas potenciais propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, emolientes e também na cicatrização de feridas (GUIMARÃES et al., 2016).

1.3.1 Potencial cicatrizante da Andiroba

A andiroba é utilizada na medicina popular no Brasil e, outros países abrangendo a floresta amazônica. Esta espécie nativa da Amazônia também é denominada andirova, andiroba - suruba, angirova, carapa e purga-de-santo-Inácio (PENNINGTON E STYLES, 1981). Sua distribuição geográfica vai da América Central até o Norte da América do Sul, incluindo a Guiana Francesa e Britânica, Caribe, Trinidad, Venezuela, Equador, Colômbia, Peru e Brasil. Esta espécie também está distribuída no oeste da Índia e na região Sul do continente africano. No Brasil, a andiroba é encontrada principalmente nos estados do Amazonas, Acre, Amapá e Pará e na Região Nordeste no Estado do Maranhão (MENDONÇA E FERRAZ, 2007; SAKURAGUI et al., 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

A andiroba é uma planta arbórea, encontrada principalmente nas várzeas e igapós, mas que também pode ser cultivada em terra firme, pertence à família botânica Meliaceae. O seu nome popular deriva do termo tupi que significa “ãdi'roba”, “óleo amargo” (Figura 4). O fruto da andiroba é uma capsula globosa que contém 4-6 repartições internas independentes (valvas). Quando o fruto cai, as valvas se separam

liberando de 4 a 12 sementes que apresentam coloração marrom com tamanho médio de 4,7 cm, mas que varia de 1 a 6 cm (MENDONÇA E FERRAZ, 2007).

Praticamente todas as partes da árvore de andiroba são utilizadas, incluindo o óleo da semente, que é empregado popularmente no tratamento de inflamações e infecções. A produção do óleo de andiroba ocorre a partir de um sistema extrativista que obtém as amêndoas da espécie que são cozidas e colocadas para secar ao longo de 30 dias. Este processo é popularmente chamado de “descanso”. Durante este período ocorre a fermentação da amêndoa necessária para que o óleo se concentre e seja posteriormente extraído. Para tanto, a massa cozida das amêndoas é prensada e o óleo é coletado. Segundo informação técnica de 10 quilos de amêndoa ocorre a extração de cerca de 4 litros de óleo de andiroba (MENDONÇA E FERRAZ, 2007).

Figura 4: Visualização da árvore e do fruto da andiroba (*Carapa guianensis*, *Meliaceae*). A amêndoa é utilizada para a produção de óleo com propriedades fitoterápicas.



Fonte: Figura organizada pelo autor desta dissertação. Fotos disponíveis em : < http://www.carapa.org/data/Image/phototheque/guianensis/C_%20guianensis%20fruits1.jpg>, < https://www.researchgate.net/publication/277044662_Estrutura_distribuicao_espacial_e_producao_de_sementes_de_andiroba_Carapa_guianensis_Aubl_no_sul_do_estado_de_Roraima>.

Com base nas informações contidas na monografia da andiroba publicada pelo Ministério da Saúde do Brasil (2015) foi obtida uma síntese de informações sobre a composição química, a partir de extratos aquosos, hidro-alcóolicos e com hexano (Tabela 1). Estudos que caracterizaram quimicamente o óleo de andiroba

descreveram que o mesmo é composto principalmente por material saponificável, já que possui alta porcentagem de ácidos graxos insaturados, o que é de grande interesse para a indústria cosmética (MINISTÉRIO DO BRASIL, 2015).

Entretanto, uma pequena porcentagem deste óleo (2 a 5%), é constituída por moléculas bioativas chamadas “limonóides”, como é o caso da: andirobina, epoxiazadiradiona, 6a-acetoxiepoxiazadiradiona, 6a-acetoxigedunina, 6b-acetoxigedunina, 11b-acetoxigedunina, 6a,11b-diacetoxigedunina, 6b,11b-diacetoxigedunina, 6a-hidroxigedunina e 7-desacetoxi-7-oxogedunina, 17b-hidroxiazadiradiona, gedunina, 6a-acetoxigedunina, 7-desacetoxi-7-oxogedunina e xilocensina k. A base química destas moléculas é a geduína, que é um metabólito secundário encontrado em espécies da família Meliaceae como a *Azadirachta indica* (Neem) e a andiroba (TAYLOR, 1984).

Tabela 1. Síntese das principais moléculas bioativas identificadas em extratos de semente andiroba obtidos com diferentes solventes e no óleo prensado (Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Classes químicas	Sementes (extratos)		
	Aquoso	Hexano	Óleo
Triterpenóides	Ausente	Presente	Presente
Tetraterpenos	Ausente	Ausente	Presente
Alcalóides	Ausente	Ausente	Presente
Taninos	Ausente	Ausente	Ausente
Limonóides	Ausente	Ausente	Presente

Os limonóides são as moléculas bioativas que parecem contribuir significativamente para as propriedades medicinais da andiroba. Em termos químicos estas moléculas apresentam polaridade moderada, são insolúveis em água e em hexano, mas são solúveis em álcool e acetona. De fato, existem hoje mais de 300 tipos de moléculas limonóides descritas na literatura, sendo também encontradas nas frutas cítricas (ROY E SHAILENDRA, 2006).

Segundo a revisão de Henriques e Penido (2014), Evidências a partir de diferentes modelos experimentais de roedores mostraram que o óleo de andiroba inibe a formação de edema através do comprometimento das vias de sinalização

desencadeadas por histamina, bradicinina e fator ativador de plaquetas. Os tetranortriterpenoides também diminuíram a intensidade da produção dos mediadores pró-inflamatórios que desencadeiam a infiltração de leucócitos no local inflamatório, incluindo os níveis de IL-1 β e TNF α . Esse fenômeno parece depender da inibição da ativação do fator nuclear κ B (NF κ B). A andiroba possui efeito antimicrobiano relatado na literatura (MECCIA et al., 2013; Wanzeler et al., 2018).

Os limonóides obtidos a partir da andiroba também apresentam efeito hepatoprotetor (BRITO et al., 2013; NINOMYA et al., 2016). Um estudo mais recente também descreveu que a andiroba diminuiria a ativação de macrófagos possuindo assim, um potencial efeito antiinflamatório (MATSUI et al., 2014; HIGUCHI et al., 2017). Milhomem-Paixão et al (2016) também descreveram que o óleo de andiroba tem uma alta capacidade antioxidante.

Considerando a sua composição química a base de limonoides é possível que os efeitos biológicos do óleo de andiroba estejam muito relacionados com estes constituintes. Especificamente em relação a sua ação na pele, um estudo conduzido por Morikawa et al (2018) descreveu que o óleo de andiroba é capaz de promover a síntese de colágeno em fibroblastos dérmicos intactos oriundos de seres humanos, sem causar citotoxicidade a estas células.

Além disto, investigações sobre o efeito da andiroba em processos cicatriciais mostraram resultados interessantes. Este é o caso da investigação conduzida por Nayak et al (2011) em ratos utilizando modelos de excisão, incisão e ferida. Para conduzir o estudo os ratos foram divididos em dois grupos em cada um dos modelos testados, e foram tratados com extrato hidroalcolico de andiroba, enquanto os ratos do grupo controle foram tratados apenas com vaselina. Os resultados mostraram uma taxa aumentada da contração da ferida, resistência à ruptura da pele e conteúdo de hidroxiprolina, indicando a sua aplicação potencial na cicatrização de lesões cutâneas.

Outro estudo conduzido em ratos da raça *Wistar* por Chia et al (2018) e publicado na *Acta Cirurgica Brasileira* avaliou os efeitos e mecanismos do tratamento tópico de uma emulsão à base de andiroba em feridas cutâneas. Os autores avaliaram tal efeito 3, 7, 15 e 20 dias após intervenção cirúrgica nos animais e observaram importante papel antiinflamatório da andiroba na cicatrização via aumento dos níveis de TGF- β . As feridas tratadas também apresentaram fibras colágenas menos densas e mais organizadas. Ainda, um estudo conduzido por Wanzeler et al

(2017) descreveu que o óleo de andiroba tem a propriedade de reduzir a intensidade de mucosite oral que é altamente prevalente em pacientes oncológicos.

Como extratos vegetais podem apresentar também efeitos negativos, em especial genotoxicidade, estudos relacionados à segurança dos mesmos é de grande relevância. Uma investigação recente conduzida por Araujo-Lima et al (2018) sugeriu que o óleo de andiroba não é genotóxico, principalmente se extraído a frio. Outro estudo feito com o limonoide 7-desacetoxi-7-oxogedunina (CG-1) encontrado na andiroba sugeriu que esta molécula tem capacidade de suprimir *in vitro* a adipogênese em adipócitos. Esta supressão ocorreu na fase inicial da diferenciação destas células reprimindo a captação da glicose pelas mesmas (MATSUMOTO et al., 2019). Este estudo é bastante interessante e acredita-se que pode ter algum nível de relevância em relação à aplicação clínico-cirúrgica de extratos a base do óleo de andiroba.

Devido à natureza insolúvel em água do óleo de andiroba, emulsões têm sido desenvolvidas para uso farmacológico. Emulsões são misturas heterogêneas que consistem em gotículas de um líquido disperso em uma segunda fase líquida imiscível contínua. De fato, a imiscibilidade líquido/líquido cria uma tensão interfacial entre os dois líquidos que atribuem instabilidade termodinâmica a tais sistemas (PEREIRA e GARCIA-ROJAS, 2015).

Na produção de emulsões estáveis, moléculas surfactantes são adicionadas ao sistema. Porém, as emulsões mais estáveis são obtidas via emulsionantes, ou via combinação de diversos agentes emulsionantes. Ferreira et al (2010) produziu várias formulações de emulsões a base de óleo de andiroba e descreveu na literatura. Entretanto, o uso de solventes é também realístico no que tange a extração das moléculas bioativas (em especial limonóides) do óleo de andiroba. Estes solventes permitem então, a produção de compostos aquosos que poderiam ser utilizados na produção de geis de fácil aplicação tópica. Nestes termos o uso de solventes como álcool e acetona tornam possível a extração das moléculas bioativas da andiroba para a produção de novos produtos, com capacidade de diluição aquosa.

1.4 Potencial cicatrizante da Copaíba

Outra planta amazônica com propriedade cicatrizante é a copaíba (*Copaifera langsdorffii*, Desf), principalmente seu óleo. Este é oriundo da árvore nativa encontrada nas regiões tropicais da América Latina e também da África Ocidental

(Figura 5). No Brasil é abundante principalmente no estado do Amazonas (PAIVA et al., 2002). O uso do óleo de copaíba é considerado fitoterápico sendo bastante difundido no Brasil e comercializado em uma grande quantidade de feiras livres populares e também, em farmácias (RIBEIRO et al., 2017); Na indústria, este óleo é utilizado na produção de fixadores de perfumes e como solventes de vernizes e tintas.

O óleo de copaíba pode ser obtido através de três processos de extração. Na extração tradicional incisões são feitas no caule da árvore utilizando-se um machado, e o óleo é coletado. Porém, este processo simples também leva a perda de grandes quantidades de óleo que escorrem pelo caule da árvore (RIBEIRO et al., 2017).

Figura 5: Visualização da árvore e dos frutos da copaiba (*Copaifera langsdorffii*, Desf). Detalhe do tronco da árvore que é perfurada para a coleta do óleo.



Fonte: Figura organizada pelo autor desta dissertação. Fotos disponíveis em: <<https://www.sementesarbocenter.com.br/sementes-de-copaiba.html>> e <https://www.researchgate.net/publication/266162532_Oleo_de_copaiba_Copaifera_sp_historico_extracao_aplicacoes_industriais_e_propriedades_medicinais>.

Além disto, a árvore “corre” grande risco de morrer e não é possível ser realizada nova colheita do óleo em uma árvore previamente extraída. O óleo de copaíba também pode ser obtido via extração total, no qual as árvores são abatidas e abertas. Este processo também não é produtivo e contribui para o desmatamento da espécie. Por fim, existe o método racional de extração do óleo de copaíba onde se realiza um pequeno orifício no tronco da árvore para se obter o veio onde está localizado o óleo. O mesmo é coletado com uma mangueira introduzida no orifício. Logo após a coleta, o canal é vedado com uma rosca que permanece no tronco e que

facilita extrações futuras de óleo na mesma árvore (ROMERO, 2007; PIERI et al., 2009).

Em termos químicos, o óleo de copaíba é constituído por ácidos resinosos diterpenos ácidos, principalmente sesquiterpenos e compostos voláteis que tornam o líquido transparente amarelo a marrom claro, que possui um forte odor característico. Acredita-se que o óleo da copaíba exerça na planta função desintoxicante e na defesa contra animais, fungos e bactérias (PIERI et al., 2009). Estudos já identificaram mais de 70 tipos de sesquiterpenos em diferentes espécies de plantas como a copaíba (PIERI et al., 2009; GELMINI et al., 2012; PORTELLA et al., 2015; ALMEIDA et al., 2016). Uma investigação conduzida por Abrão et al (2015) também descreveu atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais.

Além de ser utilizado no tratamento de feridas, popularmente o óleo de copaíba também é empregado como um fitoterápico por sua ação anti-inflamatória, antimicrobiana e analgésica (VEIGA E PINTO, 2002; SOUZA et al., 2011; ZIMMERMAM-FRANCO et al., 2013; ALENCAR et al., 2015; do ROSÁRIO et al., 2017; RIBEIRO et al., 2019; VALADAS et al., 2019.). Estas propriedades, em especial sua ação cicatrizante tem sido comprovada via estudos científicos, como o desenvolvido por Masson-Meyers et al (2013) em coelhos e ratos.

Um estudo conduzido por Gushiken et al (2017) investigou o efeito de um extrato hidroalcoólico a base de folhas da copaíba em ratos *Wistars* machos. Nestes animais, as feridas foram tratadas uma vez por dia durante 3, 7 ou 14 dias e as áreas da ferida foram medidas. Os resultados mostraram uma retração macroscópica de 10% das feridas quando tratados ou com o óleo ou com o extrato hidroalcoólico. No caso, ambos os tratamentos mostraram atividade anti-inflamatória e também indução positiva da angiogênese, reepitelização, retração de ferida e remodelação tecidual. O favorecimento da angiogênese pelo tratamento com o óleo de copaíba já tinha sido previamente relatado por Medeiros et al (2013) e por Lima et al (2013).

1.5 Potencial do Guaraná na qualidade do processo cicatricial

O guaraná (*Paullinia cupana*, (Mart.) Ducke) é uma espécie nativa da região amazônica conhecida por ter propriedades estimulantes e medicinais, pertencente a família Sapindaceae. As propriedades funcionais do guaraná podem ser atribuídas à presença de diversas moléculas bioativas na sua composição com destaque a

cafeína, teobromina, teofilina e catequinas, além de outras moléculas. Um estudo conduzido por Ângelo e colaboradores (2008), avaliou o transcriptoma do guaraná identificando autores transcritos observados no guaraná de moléculas que também são encontradas no café, chá (verde e preto) e chocolate, indicando o compartilhamento de propriedades funcionais do guaraná com estes alimentos. Entre as propriedades funcionais do guaraná observadas a partir de estudos em modelos experimentais e alguns em seres humanos se destacam: a ação antioxidante, a ação antimicrobiana, o efeito antialérgico e antiplaquetário, o efeito genoprotetor contra dano no DNA, o efeito quimiopreventivo na hepatocarcinogênese, anticarcinogênicos no melanoma de pulmão, citoprotetor contra dano testicular causado pela exposição ao cádmio, assim como efeito gastroprotetor (JIPPO et al., 2019, MACHADO et al., 2015). Na cultura popular o guaraná possui propriedades afrodisíacas. Um estudo realizado em coelhos observou a ação vasodilatadora nos corpos cavernosos (ANTUNES et al., 2001). O guaraná também apresenta ação neurofuncional agindo na memória, bem como, efeito antidepressivo (KENNEDY et al., 2004) e antifadigante, efeito antiobesogênico, termogênico e hipolipemiante (LIMA et al., 2005).

Apesar do guaraná não ser tradicionalmente utilizado em processos cicatricais, por ter propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas bem estabelecidas, um estudo prévio conduzido por Machado e colaboradores (2015) investigou se esta planta poderia ter efeito sobre células-tronco adultas obtidas a partir de tecidos lipoaspirados de mulheres híginas que se submeteram a cirurgia estética.

De fato, uma das áreas mais estudadas da ciência contemporânea envolve células-tronco. Inicialmente, se pensava que só existiriam células-embriônicas que, se corretamente induzidas poderiam regenerar tecidos e órgãos. Esta visão mudou na medida em que foram descobertas células-troncos em tecidos adultos, como é o caso do tecido adiposo. Estas células-tronco adultas poderiam ser utilizadas para regenerar tecidos incluindo cartilagem e ossos. Entretanto, um grande problema ainda a ser resolvido pela ciência moderna é que estas células-tronco se encontram em pequenas quantidades no corpo. Desta forma, quando obtemos estas células, elas devem primeiro serem cultivadas em laboratório, para depois serem transplantadas para os pacientes, a fim de auxiliarem na regeneração tecidual. O problema é que, quando as células-tronco são colocadas em cultura, muitas vezes elas envelhecem rapidamente perdendo a sua capacidade de proliferação e de diferenciação em células adultas especializadas (TURINETTO et al., 2009).

Deste modo, foi conduzido um estudo para averiguar o impacto da suplementação do guaraná na reversão de indicadores de senescência de células-tronco primárias obtidas a partir de amostras de lipoaspirados humanos. Estas células foram mantidas em condições de cultura até a 8ª passagem, quando passaram a apresentar características de senescência como diminuição na taxa de proliferação celular e aumento de indicadores do estresse oxidativo. Em culturas de 72 h de células-tronco senescentes em que foi adicionado guaraná (5 mg/g) ocorreu aumento um aumento de $79\% \pm 15\%$ na taxa de proliferação celular em relação ao grupo controle. O guaraná diminuiu marcadores do estresse oxidativo como a quantidade total de espécies reativas de oxigênio (EROs), carbonilação de proteínas, lipoperoxidação e dano no DNA avaliado por ensaio do DNA Cometa. A suplementação do guaraná também modulou diferencialmente os níveis das enzimas antioxidantes e seus respectivos genes. Os resultados sugeriram que a suplementação do guaraná poderia reverter alguns dos processos iniciais de senescência celular, em condições *in vitro* (MACHADO et al., 2015). Com base nestes resultados, a utilização do guaraná na formulação de fitoterápicos que potencialize a qualidade cicatricial foi postulada.

1.6 Potencial desenvolvimento de produtos cicatrizantes aplicáveis à cirurgia estética baseados na Andiroba, Copaíba e Guaraná

A biodiversidade da Amazônia associada ao amplo uso de produtos naturais pelas comunidades tradicionais, é indicativo de eficácia e segurança, sendo uma fonte potencial para o desenvolvimento de novos produtos, dos quais têm grande interesse para o mercado nacional e internacional (BARREIRO E BOLZANI, 2009).

Como é comentado por Guilhermino et al (2012): “A indústria farmacêutica é uma indústria intensiva em Ciência e Tecnologia (C&T), onde as inovações e as atividades de pesquisa e desenvolvimento (P&D) subjacentes são a base da competição, assumindo caráter estratégico pelas suas elevadas externalidades e impactos sociais (GADELHA, 2003). O desenvolvimento dessa indústria, além dos efeitos de indução científica e tecnológica, representa um dos pilares do desenvolvimento econômico e social.” No seu artigo, estes autores também comentam que o desenvolvimento de um fitomedicamento com comprovação

científica de segurança, eficácia e qualidade demanda menos recursos e menos riscos do que o desenvolvimento de um medicamento sintético.

Entretanto, o Brasil vive uma situação paradoxal, apesar de possuir um grande número de plantas que são altamente promissoras para uso clínico-cirúrgico, e a produção científica a respeito das mesmas ser relativamente expressiva, (CALIXTO, 2008; PALMEIRA E CAPANEMA, 2010) estudos que gerem novas tecnologias e produtos relacionados ainda são muito escassos.

Especificamente na área cirúrgica, ainda existe espaço para o desenvolvimento de produtos que possam minimizar potenciais eventos adversos, o que inclui também a cirurgia plástica estética. Este tipo de procedimento tem sido fortemente integrado as sociedades humanas de diversos países, ao longo destas últimas décadas. Neste contexto, é importante salientar que a cirurgia plástica estética opera “pacientes” e não “doentes”. Deste modo, os pacientes que se submetem a este tipo de procedimento são hígidos que pretendem melhorar a sua imagem e auto-estima. No Brasil a Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica foi fundada no ano de 1948 sendo hoje composta por 5.500 cirurgiões (SBCP, 2019), sendo que a popularização deste tipo de cirurgia está fortemente associada a evolução nas técnicas e a segurança da anestesia. Segundo Baroudi (2010), existem seis fatores que precisam ser rigorosamente considerados em relação a procedimentos cirúrgicos estéticos: (1) tempo do ato operatório; (2) a qualidade do monitoramento; (3) o local onde será realizado procedimento cirúrgico; (4) experiência do cirurgião e de sua equipe; (5) a idade do paciente; (6) a qualidade física e psicológica dos mesmos.

Em especial, na cirurgia estética existem efeitos colaterais altamente indejáveis, já que podem conduzir a outros problemas estéticos. Estes estão fortemente associados a alterações nos processos cicatriciais, que são complexos como já foi anteriormente comentado. Deste modo, uma evolução saudável das fases de cicatrização em um indivíduo hígido, tem como consequência formação de uma cicatriz final que possui bom aspecto estético e funcional. Entretanto, interferências nesses processos podem levar à formação de cicatrizes de má qualidade, que podem ser mais alargadas e pigmentadas. Assim, dentre as afecções cicatriciais, destacam-se a cicatriz hipertrófica e o quelóide. Quelóides e cicatrizes hipertróficas ocorrem a partir de hiperproliferação de fibroblastos, com consequente acúmulo de matriz extracelular, especialmente pela excessiva formação de colágeno.

A patofisiologia destas alterações relaciona-se com o processo complexo de cicatrização, que envolve as fases: inflamatória, proliferativa e de remodelação, que apesar de serem distintas, muitas vezes estão sobrepostas durante o processo de fechamento cicatricial. Segundo a revisão sobre a patofisiologia, classificação e tratamento de quelóides e cicatrizes hipertróficas conduzida por Bernan et al (2017), embora a patogênese da hipertrofia e cicatrizes queloidais não estejam ainda completamente elucidadas, a formação destas alterações cicatriciais pode ocorrer como resultado da desregulação em uma das três fases.

Embora não esteja totalmente claro, na fase da resposta inflamatória a regulação das citocinas pró – inflamatórias IL-6 e IL-8 e da citocina anti-inflamatória IL-10 pode ser crucial para a cicatrização. Esta sugestão está baseada em estudos como o realizado por Lichty et al (2000) que mostram aumento de alterações cicatriciais quando fora administrada citocina IL-6 e diminuição nas mesmas, quando foi administrada a citocina IL-10. Um estudo em fetos de camundongos confirmou a relevância da IL-10 para o sucesso da cicatrização (NAMAZI et al., 2010). Investigações complementares identificaram que a força motriz na formação de cicatrizes hipertróficas e queloidais envolveriam a desregulação dos níveis de TGF- β . Em circunstâncias normais, a produção de TGF- β é quiescente até que a lesão cicatrize. Em quelóides e cicatrizes hipertróficas, tem sido observada a superexpressão da isoforma 1 e 2 e diminuição da expressão da isoforma 3 desta molécula. Este desbalanço contribui para a criação de um ambiente, no qual ocorre aumento no número de fibroblastos ativados, que proliferam mais do que o esperado e depositam maior quantidade de colágeno na matriz extracelular. Além do mais, os fibroblastos dos quelóides podem apresentar superregulação de receptores de fatores de crescimento se tornando assim, mais sensíveis à ação do TGF- β e do PDGF (BERNAN et al., 2017). Deste modo, a amplificação da resposta inflamatória, a superexpressão de fatores de crescimento e, a ativação aumentada na produção de colágeno, parecem ser elementos chaves para as alterações nos processos cicatriciais indesejáveis.

Neste contexto, Bernan et al (2017) salientaram que um princípio importante para pacientes com quelóides é a ênfase na prevenção. Os autores aqui salientam que o uso de terapias tópicas, estudadas a este respeito, incluem o uso de gel de silicone, ácido retinóico e extrato de cebola. Assim, a identificação ou o desenvolvimento de produtos baseados na biodiversidade amazônica e no

conhecimento tradicional que aumentam a eficácia dos processos cicatriciais seria relevante, já no que tange a prevenção de efeitos colaterais indesejáveis no processo de cicatrização. No caso, tanto o óleo de andiroba quanto o óleo de copaíba apresentam ação anti-inflamatória comprovada, o que poderia explicar a eficácia dos mesmos no seu uso popular como cicatrizantes.

Bernan et al (2017) também revisaram uma série de terapias convencionais utilizadas nas alterações cicatriciais que são sintetizadas na Tabela 2. O conjunto das informações resumidas nesta tabela mostram que ainda existe a necessidade de identificação e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, para melhorar o processo cicatricial e evitar alterações cicatriciais indesejáveis, como os quelóides e as cicatrizes hipertróficas. É dentro deste contexto que o uso integrado do óleo de andiroba e da copaíba teria potencial utilização terapêutica no processo de cicatrização de cirurgias estéticas, considerando que os pacientes são hígidos e, portanto com baixo potencial de risco associado às moléculas bioativas destes produtos. Além disto, o uso milenar nestes óleos pelos povos pré - colombianos da Amazônia sugere que os mesmos possuam baixo risco de efeitos adversos importantes.

Tabela 2. Síntese das principais condutas terapêuticas convencionais em alterações cicatriciais cirurgicas (BERNAN et al., 2017).

Tratamento	Ação
Curativos oclusivos e hidratação	Usados como agente de primeira linha no tratamento e prevenção de queloides. Muito destes curativos contém silicone
Terapia de compressão	Envolve aplicação de pressão local nas áreas da pele afetadas que parece reduzir a coesividade das fibras colágenas de cicatrizes hipertróficas. Estas compressões envolve o uso de bandagens elásticas e/ou adesivas.
Uso de esteróides	Tratamentos de queloides com esteroides isolado ou como adjuvantes têm sido feitos. Frequentemente este tipo de tratamento é a primeira linha terapêutica utilizada. Esteróides mediam seus efeitos via redução da síntese de colágeno, alteração de componentes da matriz extracelular incluindo glicosaminoglicanos e também via redução de mediadores próinflamatórios. O tratamento mais frequente envolve administração intralesional via injeção na concentração de 10 a 40 mg/mL em intervalos de 4-6 semanas até que a cicatriz .
Terapias cirurgicas	Excisão e criocirurgia
Terapias adjuvantes emergentes	Radiação de queloides e cicatrizes hipertróficas. Mecanismo exato de ação ainda não totalmente esclarecido. Parece impedir a repopulação de fibroblastos após uma excisão ou a modulação de fatores de crescimento que estimulam os fibroblastos. Também pode agir via inibição da angiogênese.

Tratamento com 5-fluoracil (5-FU)	Este fármaco é uma pirimidina fluorinada que funciona como um agente antimetabólica através da inibição da timidilato sintetase que, por sua vez interrompe a síntese de RNAs. É um fármaco geralmente usado como antitumoral. Estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> mostram que ele inibe a proliferação de fibroblastos.
Imiquimode	É um fármaco imunomodulador que é agonista do receptor toll-like 7 (TLR7). Como a lesão já está fechada o uso deste fármaco induzi a produção de citocinas próinflamatórias no local (TNF α , IL-6 e IL-12, que por sua vez induz a expressão de genes apoptóticos no queleioide tecido. Como geralmente no queleioide os genes antiapoptóticos estão mais expressos, o uso do imiquimode ajuda a reduzir o tecido alterado. Evidências sugerem que o creme de imiquimode a 5% tem um potencial efeito adjuvante após a remoção cirúrgica de queloides.
Tacrolimus	É um fármaco imunossupressor com uso frequente na prevenção de rejeição de órgãos transplantados. É frequentemente utilizado como medicação tópica dermatológica no tratamento de condições como a dermatite atópica. Este fármaco parece ter múltiplos alvos nos queloides, com, por exemplo, através do bloqueio da rota de sinalização dos receptores TGF- β o que leva a redução da proliferação dos fibroblastos dos queloides.
Sirolimus	É um antibiótico produzido pelo microorganismo <i>Streptomyces hygroscopicus</i> que é um inibidor da rota mTOR. Esta rota é fundamental pois regula o crescimento, a proliferação, motilidade e sobrevivência celular. O mTOR parece ser um regulador poderoso da expressão do colágeno do tipo I em fibroblastos dérmicos. Entretanto estudos adicionais precisam ser feitos para comprovar sua eficácia e segurança.
Bleomicina	É um antibiótico citotóxico derivados do microorganismo <i>Streptomyces verticellus</i> que tem atividade antineoplásica, antiviral e antibacteriana. Estudos <i>in vitro</i> mostraram diminuição na síntese de colágeno dos fibroblastos. Este fármaco também pode induzir apoptose, o que seria benéfico em cicatrizes hipertróficas e queloides.
Doxirrubicina	É uma antraciclina caracterizada como um antibiótico antitumoral utilizado como agente antineoplásico pela sua capacidade de se intercalar ao DNA. Altera a biossíntese de colágeno sugerindo que poderia ser um tratamento de alterações cicatriciais. Entretanto, ainda não existem ensaios clínicos que comprovem o seu efeito no tratamento de queloides e cicatrizes hipertróficas.
Fator de crescimento beta transformante TGF- β	Esta molécula tem um papel crucial no processo de cicatrização. Estudos sobre a cicatrização em fetos tem mostrado que não ocorrem alterações cicatriciais nos mesmos, em grande parte devido a expressão diferencial desta molécula. Estudos clínicos sobre a eficiência do tratamento com TGF- β ainda estão em andamento.
Fator de crescimento epidérmico (EGF)	É um fator produzido principalmente por plaquetas, macrófagos e monócitos. Media os efeitos de ligação com o receptor EGF que está presente nos queratinócitos e fibroblastos. Em fetos está superregulado e é considerado um dos fatores que levam a não ocorrência de alterações cicatriciais nos mesmos.
Verapamil	É um fármaco bloqueador de canal de cálcio que inibe canais de cálcio do tipo L que estão presentes na membrana plasmática das células. É tipicamente utilizado como um fármaco antidepressivo, mas a redução do cálcio intracelular leva a outras alterações histo-fisiológicas importantes. Evidências mostram que o verapamil aumenta a síntese da enzima procologenase em queloides e cicatrizes hipertróficas e também em fibroblastos dérmicos cultivados <i>in vitro</i> levando a despolarização dos filamentos de actina, a mudanças conformacionais das células, apoptose e por fim, redução do tecido fibroso. O verapamil também tem a capacidade de inibir citocinas próinflamatórias como a IL-6, a VEGF e também o TGF- β .
Ácidos retinóicos	São potentes inibidores de metaloproteinases da matriz (MMPS) sendo utilizados com frequência no tratamento do fotoenvelhecimento e de alguns

	tipos de câncer. As MMPs estão elevadas no tecido dos queloides e podem contribuir para a sua alta taxa metabólica. Assim, estudos <i>in vitro</i> sugerem que ácidos retinoicos como a tretionina podem reduzir a produção de colágeno em cultura de fibroblastos.
Tamoxifenos	É um fármaco utilizado no tratamento do câncer de mama via ligação competitiva com o receptor de estrogênio. Além disto, é um agente antifibrotico que altera a transcrição de RNA, diminui a proliferação celular, afeta o ciclo celular causando atraso ou interrupção do mesmo na fase G1. Este fármaco também interfere na função de múltiplos fatores de crescimento incluindo o TGF- β . Estudos têm descrito que o mesmo é capaz de interferir <i>in vitro</i> na proliferação de fibroblastos de queloides. O tamoxifeno é uma medicação que em geral é bem tolerada e tem boa segurança. Estudos complementares precisam ser feitos para determinar o seu potencial impacto no tratamento de alterações cicatriciais.
Toxina Botulinica A (BTXA)	Esta toxina é capaz de inibir a exocitose da acetilcolina e assim bloquear a ativação neuromuscular deixando o músculo mais flácido. A tensão tecidual está diretamente implicada na patogênese dos queloides e o uso de botox pode reduzir a tensão na cicatriz impedindo a contração muscular durante a fase de fechamento do tecido. Entretanto existem resultados conflitantes em relação à eficácia do uso de botox para estas entidades patológicas.
Extrato de cebola	Este extrato tem sido usado na prevenção de alterações cicatriciais devido à presença de grande concentração e quercetina que tem propriedades anti-inflamatórias. O extrato leva à estabilização dos mastócitos e possui efeitos antiproliferativos nos fibroblastos. Ensaios clínicos randomizados têm sido feitos avaliando o extrato de cebola como uma terapia adjuvante, mostrando que o mesmo foi mais efetivo do que a injeção intralesional (TAC) através da melhora da dor e do prurido local. Entretanto não teve efeito diferenciado no eritema ou endurecimento da cicatriz.
Compressa baseada em silicone	Esta é outra técnica que pode ser usada para cicatrizes atróficas. É uma base de silicone enchimento tópico que pode combinar a cor da pele e texturizar a superfície, levando a melhores resultados cosméticos.
Scaffold de hidrogel	É uma espécie de esqueleto injetável de hidrogel gelatina-dextrano obtida de suínos que é aprovada na Europa para melhorar a cicatrização.
Dispositivo de tensão da pele	Dispositivo de terapia da cicatriz foi desenvolvido que pode reduzir as forças mecânicas nas incisões cirúrgicas
Abordagens algorítmicas no tratamento de queloides e cicatrizes hipertróficas	Dada a multiplicidade de possíveis tratamentos disponíveis, pode ser uma tarefa esmagadora para determinar em que para realizar estas terapias. Assim diretrizes internacionais para o tratamento de cicatrizes foram publicadas apresentando um algoritmo para a abordagem ao paciente com queloides e cicatrizes hipertróficas.

Em muitos processos industriais, a fase inicial da preparação de um produto exige a aplicação de uma técnica de extração sólido-líquido para isolar o material extraível, contido nos mais variados tipos de matrizes vegetais. No entanto, avaliações de métodos extrativos que levam em consideração a eficiência e seletividade são fatores importantes para a extração de produtos naturais, pois a composição química das matrizes vegetais é bastante complexa ocorrendo à extração de vários tipos de compostos (SIMÕES et al., 2003).

Entretanto, especialmente a copaíba possui um odor forte característico associado à presença de óleos essenciais, que poderia ser aversivo a uma parte dos

pacientes. Além disto, produtos que integrem dois óleos de origem extrativista precisam garantir que os mesmos passem por um processo de industrialização mais rigoroso que retire grande parte das potenciais impurezas e, também concentre as moléculas bioativas relacionadas a eficiência da cicatrização.

Dentro deste contexto, uma estratégia relevante seria o desenvolvimento e avaliação de um extrato hidrofílico (oleoso) em condições laboratoriais baseado nos óleos de andiroba e copaíba que concentrassem níveis elevados de limonóides e sesquiterpenos respectivamente encontrados nestes produtos, e eliminassem os produtos voláteis responsáveis pelo odor característico, principalmente da copaíba. Neste caso, a eficácia deste produto poderia ser testada via avaliação do potencial efeito na modulação da resposta inflamatória, migração e produção da matriz extracelular de fibroblastos e também, na velocidade e qualidade da cicatrização. Assim, recentemente Maia-Ribeiro et al (2019) desenvolveram um produto a base de andiroba, copaíba e guaraná do qual foi obtido um extrato bifásico combinado, cujo processo de obtenção está em fase de depósito de patente junto ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual. O referido produto denominado ACG foi desenvolvido com recursos obtidos pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas (FAPEAM – Universal; número do processo: 002/2018). Tal produto foi desenvolvido com base nas evidências previamente publicadas na literatura e baseado em uma busca de patentes que poderiam ser similares. Os resultados desta busca são resumidos na Tabela 3.

A busca conduzida no banco de dados INPI e nos bancos de patentes internacionais identificou diversos produtos nos quais a andiroba e a copaíba, estão incluídos (Tabela 3). As bases de dados acessados foram: (1) LATIPAT – sendo um portal com informações de vários países da América Latina e Espanha, como, por exemplo, Brasil, Argentina, México, Cuba, Chile, Uruguai, Peru, etc. É resultado de um trabalho conjunto entre a Organização Mundial da Propriedade Intelectual (OMPI), Escritório Europeu de Patentes (EPO), Oficina Espanhola de Patentes e Marcas (OEPM) e de mais de 18 Institutos de Patentes da América Latina; (2) ESPACENET - Esta base, possui mais de 90 milhões de documentos de patente de diferentes países sendo mantida pelo Escritório Europeu de Patentes (EPO). A base permite busca nos dados bibliográficos dos documentos de patente, bem como, o acesso ao texto completo de grande parte destes documentos, inclusive de pedidos depositados no Brasil. Geralmente as duas bases LATIPAT e ESPACENET são acessadas de modo conjunto; (3) PATENTSCOPE - Portal mantido pela Organização Mundial da

Propriedade Intelectual (OMPI), que possibilita o acesso a atividades e serviços relacionados ao Tratado de Cooperação em Matéria de Patentes (PCT). Este portal permite elaborar gráficos com os resultados das buscas e disponibiliza o acesso a uma base que contém pedidos de patente depositados via PCT, além de coleções de muitos países, inclusive de pedidos depositados no Brasil.

Na busca foi encontrado um número menos elevado de patentes, no qual eram utilizadas de modo concomitante a andiroba e a copaíba: INPI = 16; LATIPAT/ESPACENET = 15; PATENTSCOPE= 04. Entretanto, não foram identificadas patentes que utilizavam concomitantemente andiroba, copaíba e guaraná. Neste sentido, o produto ACG foi considerado potencialmente original e inovador no processo de obtenção bem como na composição da mistura, que são condições essenciais para o depósito de uma patente.

Tabela 3. Síntese de patentes contendo andiroba e copaíba, identificadas a partir da busca na base de dados do Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) e em bases internacionais de patentes.

Base de Dados	Andiroba	Copaiba
INPI	Total (40)	Total (52)
	Pele	Pele
	Total (40)	Total (52)
	Cosmético/	Cosmético/
	Hidratante (5)	Hidratante (09)
	Banho* (4)	Banho* (4)
	Cicatrizante	Cicatrizante
	Lesões (2)	Lesões (7)
LATIPAT/ ESPACENET PATENTSCOPE	Repelente (15)	Repelente (09)
	Antimicrobiano (2)	Antimicrobiano (2)
	Outros (12)	Outros (21)
	Total (41)	Total (52)
	Total (61)	Total (70)

* Produtos de banho: shampoo, condicionador, sabonete, sais de banho

Fonte: Maia-Ribeiro et al (2019)

Entretanto, para que o produto e o processo desenvolvido sejam potencialmente comercializados é necessário a implementação de estudos de Fase 1 utilizando modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Modelos *in vitro* geralmente utilizam fibroblastos, enquanto que modelos *in vivo* são realizados em roedores ou outros animais. Porém, como estudos em roedores são cada vez mais difíceis de serem realizados por que envolvem aspectos éticos, um tempo maior para a obtenção de resultados e um custo mais elevado, outros modelos experimentais em invertebrados têm sido também utilizados para investigações de novos produtos. Entre estes se encontra o anelídeo *Eisenia fétida*, popularmente conhecido como minhoca californiana.

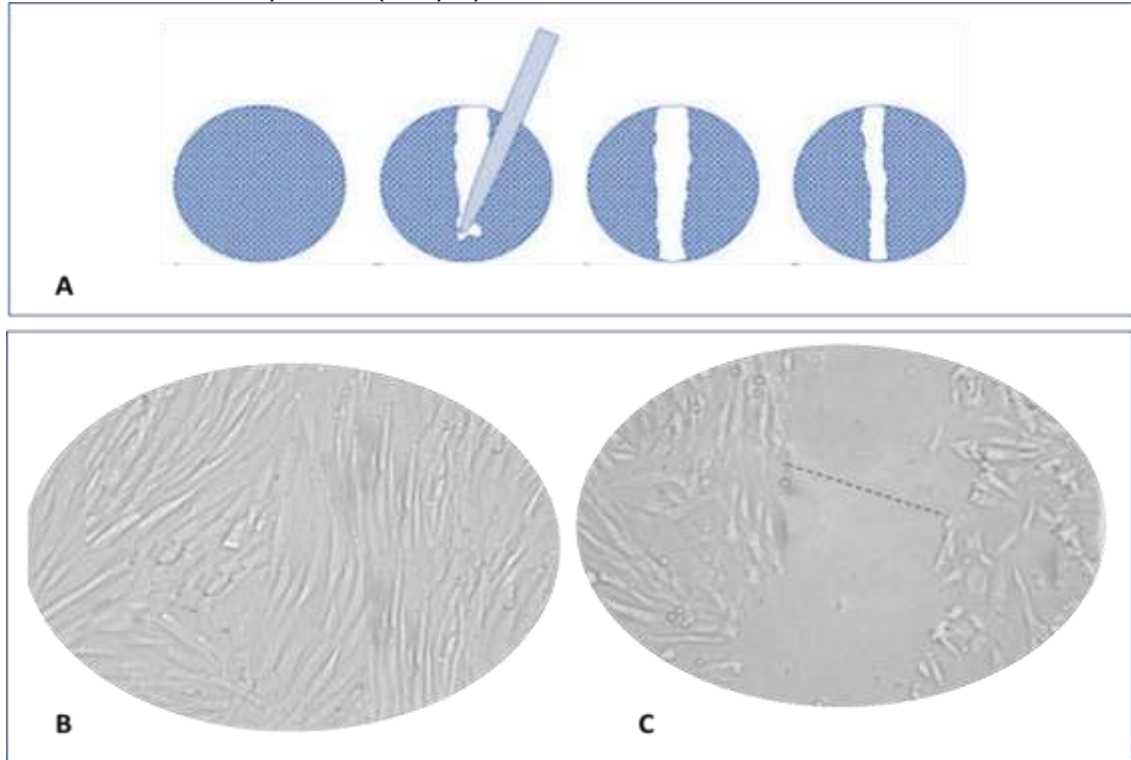
Assim, seria importante realizar uso concomitante destes dois modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, para averiguar indicadores de eficácia e segurança do produto ACG. A relevância do uso destes modelos é a seguir comentada.

1.7 Modelo experimental *in vitro* de fibroblastos

Apesar da grande quantidade de plantas amazônicas com potencial cicatrizante que são utilizadas na medicina tradicional, o número de estudos controlados que indicam sua eficácia e segurança ainda é bastante baixo. Em parte isto ocorre pela necessidade de realização de estudos em modelos animais, como roedores e também em seres humanos que precisam de aprovação nos respectivos Comitês de Ética em Pesquisa e, ainda possuem alto custo. Muitos destes estudos acabam falhando em demonstrar a eficácia de uma da planta com um potencial efeito cicatrizante já que não é ética e tecnicamente viável a realização de pesquisas que envolvam grande número de tratamentos ou de animais, ou seres humanos. Com a perspectiva de ampliar estudos na área da cicatrização, pesquisadores desenvolveram um modelo experimental *in vitro* denominado “*Scratch assay*” (“teste do arranhão”) originalmente desenvolvido por Liang et al (2007) cultura de fibroblastos, mas que também pode ser aplicado a cultura de queratinócitos (Figura 6).

O “*scratch assay*” é um método fácil, de baixo custo e bem desenvolvido para medir a migração e proliferação celular *in vitro* de fibroblastos. As etapas básicas envolvem a criação de um “arranhão” com a ponta da pipeta em uma monocamada de células, capturando as imagens no início e, em intervalos regulares durante a migração de células.

Figura 6: Método do arranhão (*scratch assay*) em cultura de fibroblastos. (A) Inicialmente os fibroblastos são colocados em condições padronizadas de cultura celular até formarem uma monocamada. Logo após com o auxílio de uma pipeta com ponteira para 10 a 200 μL é feito um arranhão (rasgo) na parte central da monocamada. Este rasgo mimetiza “*in vitro*” as condições de uma ferida ou corte cirúrgico, permitindo avaliar a taxa de migração celular para o local que ocorreu a ruptura mecânica e os marcadores de proliferação celular que são ativados na presença do arranhão; (B) microfotografia de uma monocamada íntegra de fibroblastos; (C) microfotografia de uma monocamada “arranhada” de fibroblastos em microscopia ótica (100 μm).



Fonte: Figura elaborada e organizada pelo autor desta dissertação.

Em comparação com outros métodos, o ensaio de arranhadura *in vitro* é particularmente adequado para estudos sobre os efeitos das interações célula-matriz e célula-célula na migração celular que imitam a migração celular durante a cicatrização de feridas *in vivo* e, são compatíveis com imagens de células vivas durante a migração para monitorar eventos intracelulares, se desejado. Além de monitorar a migração de populações de células homogêneas, esse método também foi adotado para avaliar outros marcadores de cicatrização, incluindo marcadores oxidativos, inflamatórios e apoptóticos em nível de proteína e de expressão de genes (CORY, 2010).

Este método permite o screening rápido de um maior número de extratos de plantas com potencial efeito cicatrizante que seria de interesse para a cirurgia. Por serem conduzidos em linhagens comerciais de células (fibroblastos e queratinócitos) produzidas pela *American Type Culture Collection* (ATCC), Estados Unidos que é uma organização sem fins-lucrativos que desenvolveu e produz mais de 4000 tipos de

linhagens celulares humanas e de animais. O Banco de Células do Rio de Janeiro, que também é uma organização não-governamental, geralmente adquire estas linhagens e congela em condições padronizadas de alta qualidade. Uma vez que exista a necessidade de aquisição de determinada linhagem, a mesma pode ser facilmente obtida via Banco de Células do Rio de Janeiro que envia em condições estéreis e apropriadas uma garrafa com a linhagem celular desejada, que chega entre 48-72 horas até qualquer laboratório de pesquisa no Brasil.

1.8 Minhocas californianas como modelo de cicatrização e regeneração

Como destacado anteriormente, o desenvolvimento de terapêuticas efetivas com potenciais de cicatrização de feridas tem sido altamente esperado, uma vez que níveis significativos de morbidade e mortalidade induzida por feridas em todo o mundo têm exercido intensos prejuízos econômicos e sociais em toda a sociedade (SEM et al., 2009). Para tanto, muitos estudos são conduzidos em modelos animais *in vivo*. Um modelo que chama muito atenção em relação às suas propriedades regenerativas, diz respeito aos vermes anelídeos (minhocas), como é o caso da espécie *Eisenia fetida*, *Lumbricidae* (Savieny, 1826), popularmente conhecida como minhoca vermelha ou minhoca californiana.

De fato, o próprio uso destes animais no tratamento de feridas despertou a atenção dos cientistas. Como destaca a revisão feita por Yang et al (2017), existe uma longa história registrada em que minhocas foram utilizadas para fins médicos tanto em muitos países asiáticos e quanto na América do Norte. Na antiga China, os médicos usavam minhocas descartadas para tratar várias doenças comuns, incluindo queimaduras, artrite, coceira e inflamação. Com o desenvolvimento da ciência moderna, vários componentes bioativos com funções médicas foram extraídos da minhoca. Estes incluem a glicoproteína G-90 extraída da *E. fetida* que possui várias atividades biológicas, incluindo ação antimicrobiana, antitumoral, antiviral, anticoagulante, antioxidantes e funções mitogênicas. Outros estudos mostraram que proteínas encontradas em minhocas seriam benéficas em processos cicatriciais e regenerativos. Estudos na minhoca mostraram que a proteína G-90 acelera a regeneração após três dias da amputação. Este processo está associado à indução pela proteína G-90 de proteínas de choque-térmico como a HSP-70 (YANG et al., 2019). Deng et al (2019) também descreveram que proteínas obtidas a partir da

minhoca poderiam ser eficientes no tratamento de feridas com dificuldade de cicatrização, que são prevalentes em pacientes idosos.

De fato, a minhoca é um animal que está sendo cada vez mais utilizado como modelo experimental de estudos de regeneração e cicatrização tecidual. Isto porque, a cicatrização dos ferimentos e a regeneração das partes perdidas são muito disseminadas entre os invertebrados, especialmente os da classe inferior. Isto porque nos locais lesados, esses animais conseguem formar massa de células não especializadas denominadas blastema, que estão localizados abaixo da epiderme que, por serem células totipotentes têm a capacidade de especializar-se para formar os tecidos lesionados ou perdidos (BERGHOLZ, 2004).

As minhocas mostram um amplo espectro de potencial regenerativo capazes de regenerar mais de dois terços de seu corpo, como é o caso da *E.fetida*. Após uma lesão, esta espécie tem a capacidade de regenerar os segmentos posteriores em um período de várias semanas. Antes de comentar de modo mais aprofundado aspectos associados com a regeneração tecidual da minhoca, que torna este animal um modelo experimental apropriado para estudos envolvendo cirurgia estética, é relevante apresentar as características eco-evolutivas e biológicas destes animais.

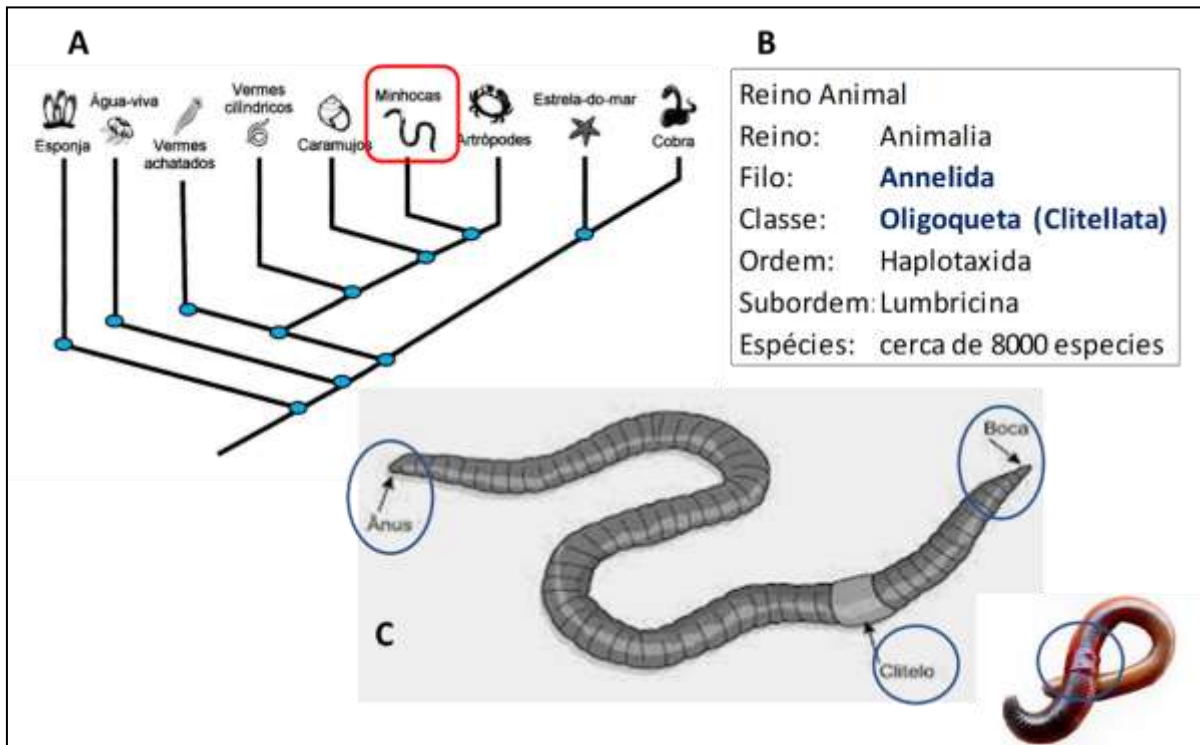
A minhoca *Eisenia fetida*, *Lumbricidae* (Savieny,1826), pertence ao Filo Annelida que agrupa animais invertebrados segmentados, sendo a maioria de vida livre, com exceção das sangue-sugas. Estes animais vivem geralmente na terra, mas também são encontrados em água doce e marinha. Em termos evolutivos (Figuras 4 A,B) as minhocas são animais mais complexos que as esponjas, os cnidários e os moluscos sendo os primeiros a apresentarem simetria bilateral e segmentação corporal. A sua anatomia externa é bastante simples: apresentam uma boca sem processos de encefalização, sem ocorrência de olhos, nariz e orelhas. As minhocas são hermafroditas possuindo sistema reprodutivo masculino e feminino completo, com exceção da falta de pênis. Apesar de serem hermafroditas possuem reprodução cruzada ocorrendo troca de sêmen entre duas minhocas que fertilizam óvulos presentes no ovário. O corpo da minhoca é segmentado, e no animal reprodutivamente maduro se observa uma estrutura chamada clitelo que é feita de acúmulo de glândulas modificadas da epiderme que secretam um muco especial, que auxilia na transferência e sobrevivência do esperma entre as duas minhocas. As minhocas chegam à maturidade reprodutiva entre 60 a 90 dias após o seu nascimento

e podem viver até 16 anos. Na extremidade posterior encontra-se o ânus (Figura 7A). (LEE, 1985).

A ecologia da minhoca é bastante simples e eficiente: são animais cavadores que engolem terra e detritos de modo constante produzindo uma excreta conhecida como “humus” que é um excelente adubo. Em termos embrionários, assim como os seres humanos as minhocas são animais triploblásticos, pois diferenciam inicialmente três camadas germinativas (ectoderma, mesoderma e endoderma), celomados, que constitui uma cavidade interna corporal onde estão localizadas todas as vísceras. Entretanto, ao contrário dos seres humanos são animais protostômios porque o blastóporo, que é uma estrutura embrionária dá origem a boca, enquanto que nos humanos, que são deuterostômios originam o ânus (LEE, 1985).

O tegumento da minhoca é constituído por uma cutícula secretada por uma monocamada de tecido epitelial entremeado por células glandulares que produzem o muco que recobre e protege a minhoca. Esta camada epidérmica está assentada diretamente um tecido muscular circular, que por sua vez se liga a um tecido muscular longitudinal. Esta distribuição espacial do tecido muscular gera eficiência necessária para o deslocamento da minhoca no seu habitat. Na região, cada segmento exibe um par de cerdas que serve para auxiliar na locomoção e na escavação do solo. O tecido muscular longitudinal se liga uma camada de tecido de origem mesodérmica, chamada “peritônio” que reveste a cavidade interna do organismo (LEE, 1985). Esta célula tem alto poder de diferenciação porque, é dela que as células musculares se originam e se regeneram (Figura 7).

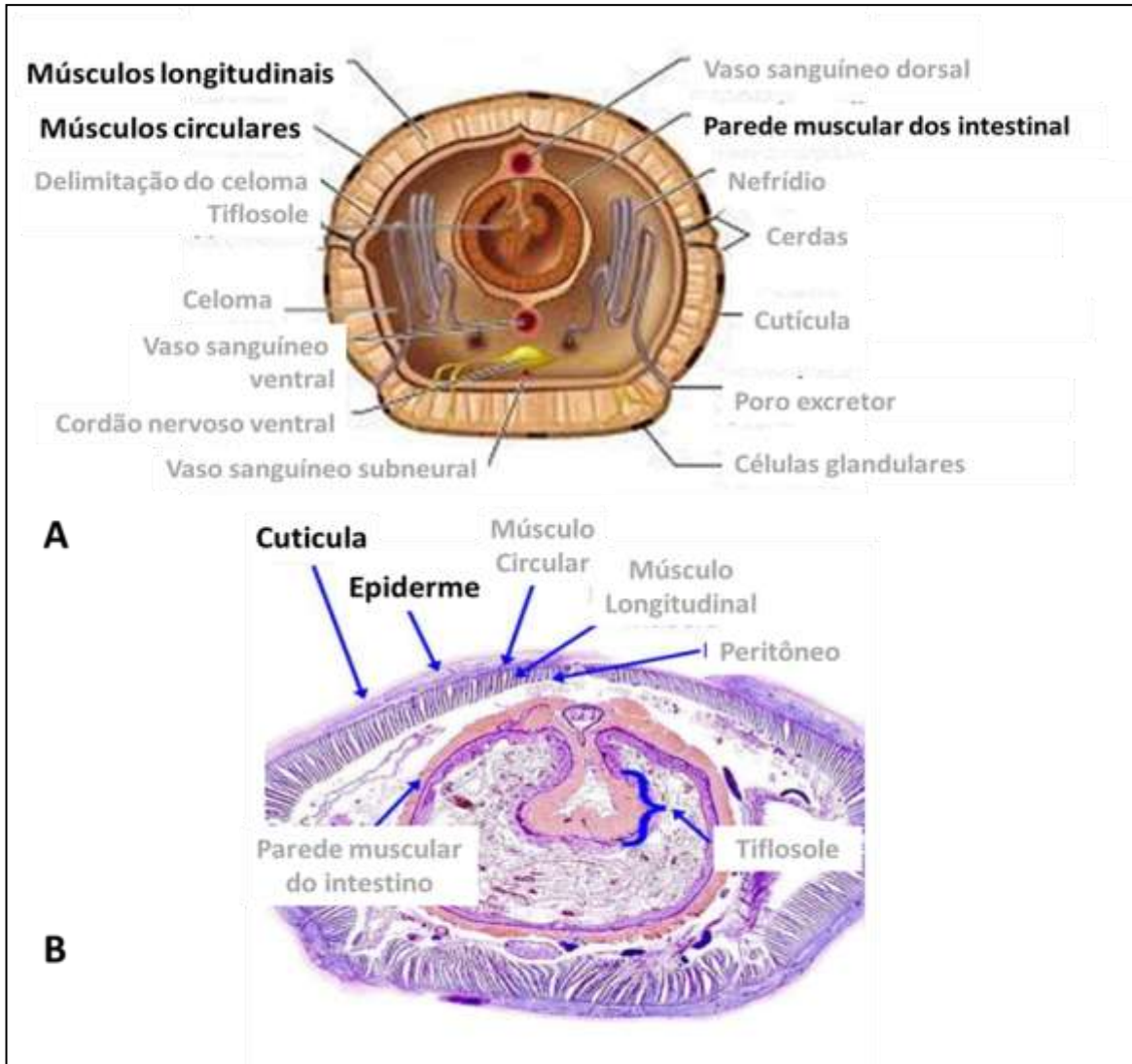
Figura 7: Síntese de aspectos filogenéticos e características gerais da anatomia externa da minhoca. (A) árvore filogenética; (B) resumo da sistemática de minhocas como a *Eisenia fetida*; (C) anatomia externa das minhocas.



Fonte: Figura organizada pelo autor desta dissertação. Ilustrações obtidas em Google imagens, informações obtidas em LEE, 1985.

Em relação a sua anatomia interna, a minhoca possui sistema circulatório fechado com cinco corações localizados nos primeiros segmentos e dois vasos (dorsal e ventral bem desenvolvido) que estão associados com uma rede de capilares arteriais e venosos. O sistema digestório da minhoca é complexo com diversos órgãos similares a dos seres humanos e de outros vertebrados: este sistema inicia pela boca que se liga a faringe, esôfago, papo/moela, estômago, intestinos e ânus. O sistema excretor rudimentar associado ao revestimento epidérmico-muscular. Minhocas (Figura 8) não possuem sistema respiratório bem desenvolvido e a respiração é feita via trocas gasosas na epiderme (respiração cuticular) (LEE, 1985; MARTINEZ, 1998).

Figura 8: Corte transversal da minhoca. (A) principais constituintes do tegumento e da cavidade celômica; (B) corte histológico destacando as principais estruturas da parede corporal da minhoca e do celoma.

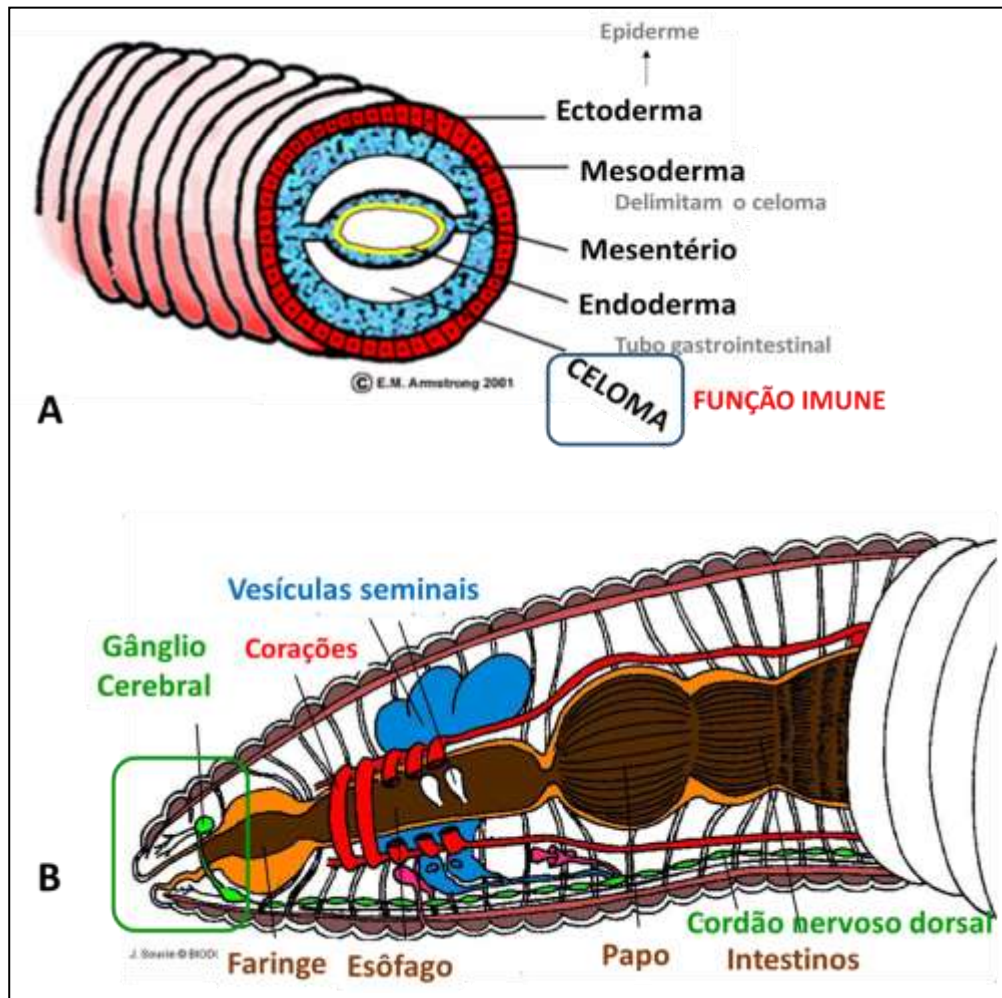


Fonte: Earthworm Anatomy and Dissection Guide. Disponível em: <
https://www.biologyjunction.com/earthworm_dissection.htm>.

Em relação ao sistema nervoso os anelídeos são animais mais complexos do que os moluscos e os cnidários, apresentando um sistema nervoso central e periférico constituído por dois gânglios cerebrais ligados a um cordão que contorna o início da faringe (sistema nervoso ganglionar anelar), outros gânglios localizados em outros segmentos, e um cordão nervoso ventral que liga todos os segmentos da minhoca aos gânglios cerebrais.

A minhoca possui uma rede de receptores sensoriais bem desenvolvidos que permite que ela perceba diversas condições ambientais físico-químicas. A minhoca também possui um sistema nervoso autônomo relacionado com o seu sistema digestório (Figura 9).

Figura 9: Esquema geral da anatomia interna da minhoca: (A) destaque para o celoma que é interseptado e que produz um muco rico em células imunes similares a neutrófilos, basófilos, macrófagos que são extrudados por poros dorsais quando a minhoca é exposta a agentes aversivos como o éter ou a choque elétrico. Este muco tem uma cor amarelada de fácil reconhecimento sendo utilizado como modelo experimental em estudos de resposta inflamatória; (B) anatomia dos segmentos iniciais da minhoca.

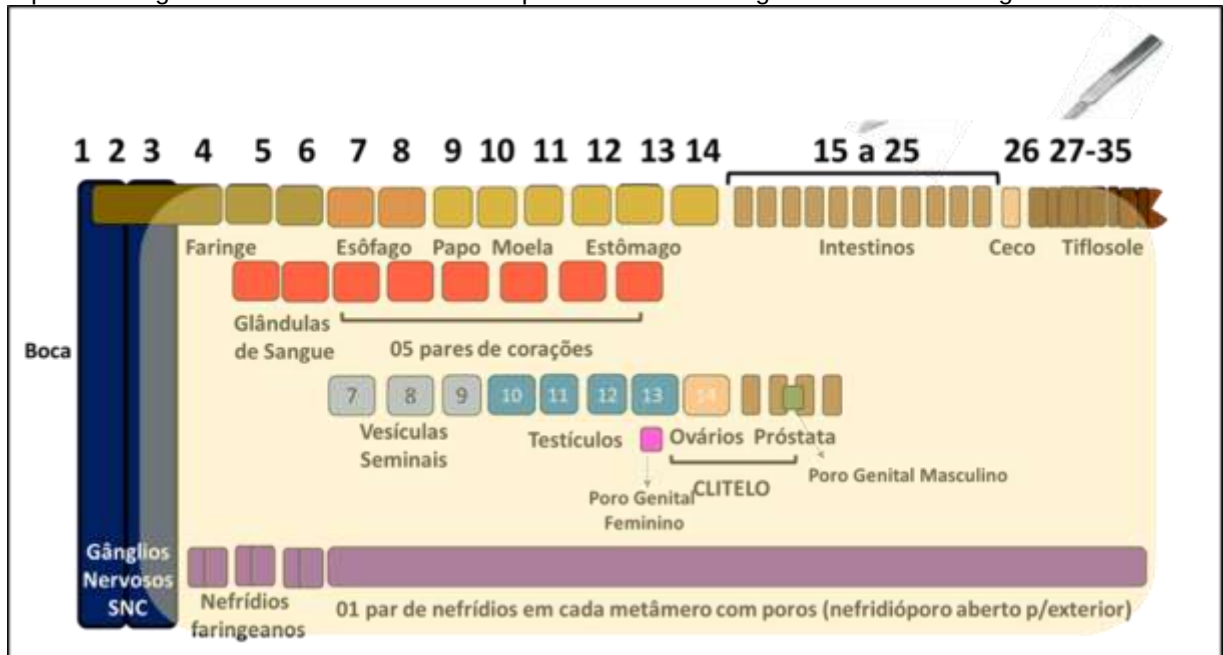


Fonte: Earthworm Anatomy and Dissection Guide. Disponível em: <
https://www.biologyjunction.com/earthworm_dissection.htm>.

Os órgãos reprodutivos da minhoca também ficam localizados nos primeiros quinze segmentos. Nestes segmentos também são encontrados duas bolsas que produzem o sangue da minhoca.

É possível reconhecer as estruturas internas da minhoca de acordo com o segmento corporal externo. Por este motivo, um esquema das mesmas em relação a estes segmentos foi organizado e é apresentado na Figura 10. Em estudos envolvendo corte e regeneração tecidual este esquema pode facilitar a identificação das regiões a serem seccionadas. Por exemplo, em estudos de regeneração completa de órgãos, geralmente os últimos 5- segmentos posteriores ou anteriores são extirpados.

Figura 10: Esquema geral da relação entre segmentos corporais externos e principais órgãos internos da minhoca. Excisões entre os segmentos finais caudais da minhoca poderiam ser conduzidas para reproduzir algum nível de similaridade com procedimentos cirúrgicos estéticos na região abdominal.



Fonte: Earthworm Anatomy and Dissection Guide. Disponível em:

<https://www.biologyjunction.com/earthworm_dissection.htm>. Adaptado pelo autor desta dissertação.

Na embriogênese animal, muitos genes ativos nas células-troncos do embrião, depois de certo tempo são desligados por mecanismos epigenéticos. Deste modo, as células especializadas não conseguem induzir regeneração ou mesmo cicatrização. No caso, a cicatrização em seres humanos será induzida via estímulo na proliferação de células-tronco adultas que estão presentes no tecido epitelial (camada germinativa), e pelo estímulo na proliferação de fibroblastos que, em geral estão em baixa concentração no tecido dérmico, mergulhados no meio extracelular que contém fibras e outras substâncias, como o ácido hialurônico que são produzidos por estas células (ANDREWS E PAYTON, 2019).

Estudos prévios têm sugerido que a minhoca consegue regenerar tecidos e órgãos excisados via ativação de genes presentes em células-tronco embrionárias que, em vertebrados permanecem inativos após este período. Alguns destes genes estão envolvidos no desencadeamento da metamerização (segmentação corporal), neurogênese, e diferenciação de outras estruturas teciduais. Ou seja, quando uma parte da minhoca é cortada, as células localizadas na região que permaneceram (no caso deste trabalho, do 5º ao 7º segmento) se desdiferenciam em células embrionárias, para depois iniciar a rediferenciação (regeneração) das estruturas

perdidas (BHAMBRI et al., 2018). O estudo indicou que, pelo menos três genes são relevantes neste processo.

Uma análise das alterações da expressão gênica tanto nas células recém-regeneradas, quanto no tecido adjacente após a amputação foi conduzida por Bhambri et al (2018). O estudo indicou que, pelo menos três genes são relevantes neste processo: o primeiro gene é o gene TBXT que determina a síntese de uma proteína denominada Brachyury. Esta proteína é um fator de transcrição encontrado em todos os animais com simetria bilateral, como é o caso das minhocas e dos seres humanos. Este gene parece ter um papel altamente conservado na evolução animal, determinando a linha média no início da embriogênese, que por sua vez define os lados (esquerdo e direito) e as regiões caudais e cefálicas do embrião. Este gene também induz a diferenciação do mesoderma durante a gastrulação (SCHOLZ, 2003).

Nas minhocas íntegras ele geralmente se expressa durante a embriogênese destes organismos (KITAKOSHI E SHIMIZU, 2010). Entretanto, quando ocorre mutação neste gene, o mesmo pode voltar a se expressar de maneira não controlada estando associado à carcinogênese (SHAH et al., 2017). Por outro lado, o gene Brachyury se encontra expresso em células-tronco, como é o caso das encontradas na geleia de Wharton do cordão umbilical que têm sido utilizadas em estudos de medicina regenerativa (BAHMANPOUR et al., 2019).

O segundo gene que Bhambri et al (2018) observaram na regeneração das minhocas foi o gene Even-skipped que está incluído no grupo de genes do desenvolvimento chamado “regra dos pares” (*pair-rules* genes). Estes genes dão origem a fatores de transcrição que induzem a segmentação corporal, como é o caso do corpo da minhoca (segmentos corporais, metâmeros) e mesmo do ser humano (cabeça, tronco apresentando tórax e abdômen fundidos, e apêndices corporais).

O terceiro gene que foi super expresso ao longo da regeneração foi o gene SOX4. Este gene é também um fator de transcrição que está diretamente envolvido com o desenvolvimento embrionário, tanto em seres humanos quanto em minhocas. A proteína modificada SOX4 atua como um regulador que forma um complexo proteico com outras proteínas. Este gene parece atuar na transição de células do epiblasto (ectoderma primitivo) que se diferenciam em células mesodérmicas durante a gastrulação. Nos seres humanos, mutações no gene SOX4 têm sido associadas a malformações embrionárias, e em indivíduos adultos a reativação deste gene associa-

se a agressividade (metástases) de vários tipos de câncer (LOURENÇO E COFFER, 2017).

Com base nestas evidências é possível que o gene SOX-4 possa ser utilizado como marcador da eficácia de compostos com o óleo integrado de andiroba, copaíba e guaraná nos processos iniciais de cicatrização/regeneração tecidual de minhocas submetidas a excisão similar a cirurgia abdominal estética nos segmentos 15 a 25.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o efeito de um produto obtido via extração combinada de andiroba, copaíba e guaraná (ACG) sob a forma de óleo bifásico e emulsão através da análise de modelos de cicatrização *in vitro* (utilizando fibroblastos dérmicos) e na minhoca californiana *Eisenia fetida*, modelo *in vivo* de regeneração corporal via incisão cirúrgica da região caudal.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a capacidade antioxidante e genoprotetora do óleo ACG;
- Analisar o efeito do óleo ACG em cultura de fibroblastos não-rasgados e rasgados (Stratch assay) avaliando a:
 - taxa de migração celular;
 - modulação de marcadores inflamatórios;
 - modulação de marcadores oxidativos;
 - modulação de dois marcadores de proliferação celular (FGF1 e KGF).
- Analisar o efeito do produto ACG na qualidade de regeneração de minhocas (após 7 dias) submetidas a incisão cirúrgica dos últimos quatro segmentos caudais através da análise do padrão:
 - de mielinização dos segmentos regenerados;
 - de distribuição de cerdas ventrais;
 - das proporções dos segmentos regenerados em relação aos restantes;
 - de outras alterações morfológicas;
- Analisar o efeito do produto ACG na modulação da expressão do gene SOX-4 no 5º ao 7º segmento 24 horas após a incisão cirúrgica.

3 MÉTODO

3.1 Delineamento do estudo

O presente estudo é constituído de três etapas integrativas: (1) Avaliação da capacidade do extrato bifásico ACG avaliando sua capacidade antioxidante; (2) Estudo *in vitro* de fibroblastos dérmicos rasgados; (3) Estudo *in vivo* do efeito na qualidade da regeneração caudal e modulação da expressão do SOX-4, gene considerado de regeneração em *Eisenia fetida*.

3.2 Caracterização do Produto ACG

Um dos problemas associados ao uso da andiroba (*Carapa guianenses*, *Meliaceae*) e também da copaíba (*Copaifera langsdorffii*, *Leguminosae*) em processos cicatriciais diz respeito ao forte odor destes óleos. Para minimizar esta característica e concentrar moléculas bioativas presentes nestes óleos, Maia-Ribeiro et al (2019) desenvolveram previamente um processo de extração e produção de um óleo com baixo odor e com maior concentração de limonóides e terpenos a partir de dois óleos brutos de andiroba e copaíba utilizando como solventes álcool 70% e acetona 100% e, aquecimento para reintegrar as moléculas bioativas dissolvidas na parte aquosa (hidrolato) a parte lipofílica (óleo). Este processo levou a evaporação dos óleos essenciais que produzem o odor característico dos óleos brutos, diminuindo assim a detecção dos mesmos. Como estes óleos não possuem polifenóis que apresentam diversas propriedades biológicas como ação antioxidante, anti-inflamatória, ao produto foi adicionado uma solução feita com semente torrada de guaraná obtida através da extração com água quente.

Uma vez que este processo foi desenvolvido previamente no Laboratório Biogenômica da Universidade Federal de Santa Maria em colaboração com a Fundação Universidade Aberta da Terceira Idade (FUNATI) o mesmo está em processo de submissão para obtenção de uma patente. Por este motivo, o detalhamento do processo de obtenção do óleo ACG® não será aqui descrito, a fim de proteger a propriedade intelectual dos inventores.

Nos estudos *in vitro*, para avaliar a capacidade antioxidante e potencial genotóxico, o efeito na cultura celular o óleo bifásico foi previamente diluído 10% de álcool etílico para permitir sua integração em soluções oleosas. Este procedimento foi realizado de modo similar ao descrito por Bakargna-Via et al (2014).

Nos estudos *in vivo* com minhocas, parte do produto foi utilizado para preparar uma emulsão que foi também testada nas minhocas. Os reagentes e procedimentos de preparo da emulsão foram os utilizados na indústria farmacêutica, pela farmacêutica Cibebe Ferreira Teixeira.

3.3 Capacidade antioxidante do produto ACG

A capacidade antioxidante foi avaliada via Teste DPPH: O 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) que é um radical pouco estável, de cor púrpura intensa. Este ensaio baseia-se na medida da capacidade antioxidante de substâncias para sequestrar o radical estável DPPH que pode ser avaliada medindo a diminuição da sua absorbância. A percentagem de DPPH que não reagiu representa a percentagem de capacidade antioxidante (%AA) e é proporcional a concentração de substância antioxidante. A concentração que provoca uma diminuição na concentração inicial de DPPH em 50% é definida como concentração eficaz (EC50) ou concentração inibitória (IC50). O teste foi realizado por espectrofotometria conforme Zhang et al., (2007).

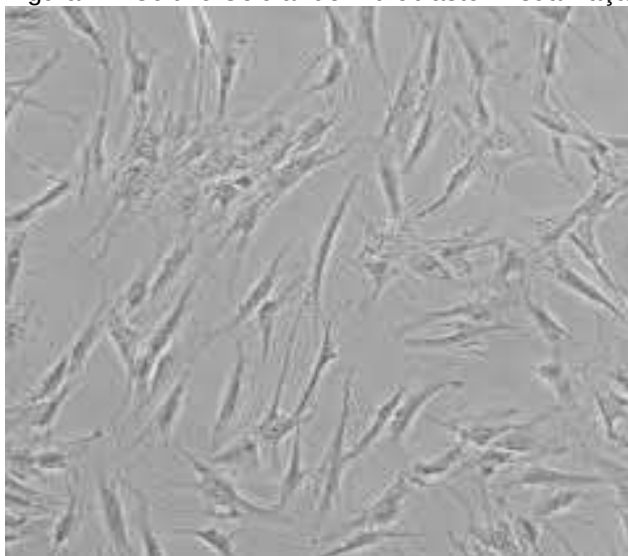
3.4 Genotoxicidade e Genoproteção

O teste gemo é um método *in vitro* da capacidade genomodificadora de compostos químicos e sintéticos. Este é um protocolo que não utiliza sistemas biológicos, utilizado e desenvolvido para a quantificação do DNA dupla-fita (dsDNA) exposto a substâncias químicas. Esse método utiliza placa preta de 96 poços, utilizando um corante altamente específico de dsDNA (PicoGreen®) e DNA purificado de timo de bezerro (dsDNA). O teste inclui um pró-oxidante de referência, peróxido de hidrogênio (H_2O_2 3 molar), que permite a análise comparativa dos dados obtidos, classificando a substância testada ACG em vários níveis de genotoxicidade e ainda se a mesma apresenta potencial de genoproteção (CADONÁ et al., 2013).

3.5 Protocolos *in vitro* com fibroblastos

A parte experimental do estudo foi conduzida nas dependências do Laboratório de Biogenômica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) no qual já desenvolve diversos estudos em parceria com instituições de pesquisa da Amazônia. Fibroblastos da linhagem HFF-1 (ATCC® SCRC-1041™) descongelados pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (Figura 11), foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 15% de soro bovino fetal, 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina) e 1% de antifúngico (anfotericina B). As células permaneceram em cultivo celular em condições estéreis em incubadora apropriada a 37°C com saturação de 5% de CO₂ durante o tempo necessário para se adquirir a quantidade de células necessária para a realização dos experimentos.

Figura 11: Cultivo Celular de Fibroblasto. Visualização através de microscópio invertido.



Fonte das Imagens: O autor.

Para a realização dos testes *in vitro* o ACG foi dissolvido em DMSO 1%. Os demais testes foram feitos com a concentração de 2µL/mL no qual fibroblastos íntegros e rasgados foram expostos. O efeito do ACG na mortalidade, proliferação celular e migração dos fibroblastos foram determinados. Foram avaliados também o efeito na modulação de marcadores oxidativos, de marcadores proliferativos (FGF-1 e KGF) e inflamatórios.

3.5.1 Ensaios utilizados no estudo *in vitro*

Indicadores do estresse oxidativo: A quantificação de EROs foi feita pelo ensaio da diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) que mede a presença de EROs, principalmente H_2O_2 (HALLIWELL E WHITEMAN, 2004). Os níveis proteicos das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase foram mensurados via teste imunoenzimático ELISA apropriado após 24 horas e 72 horas de tratamento, utilizando-se o kit Abcam[®], conforme recomendações do fabricante.

Indicadores de proliferação celular: Foram quantificados dois marcadores importantes de fatores de crescimento: fator de crescimento de fibroblastos (FGF-1) e proliferação de fibroblastos e queratinócitos fortemente estimulados (ŽERAŇSKA et al., 2016) e fator de crescimento de queratinócitos (KGF-1) também conhecido como FGF -7 que induz atividades mitogênicas e de sobrevivência celular. A quantificação desses dois marcadores será realizada por imunensaio utilizando kits similares e procedimentos metodológicos descritos anteriormente. A sensibilidade e a faixa de detecção de FGF-1 e KGF-1 foram respectivamente: FGF (0,78 -50 ng / mL) e KGF (25 -1600 ng / mL).

Marcadores inflamatórios: As citocinas pró - inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ), bem como, a citocina anti-inflamatória (IL-10), foram mensuradas utilizando-se o kit Quantikine[®] Elisa, e os procedimentos experimentais seguiram as recomendações da fabricante Abcam[®]. Todos os imunoenaios foram cortesia do Laboratório de Análises Clínicas LabMed Ltda onde foram feitas as análises.

3.6 Protocolos *in vivo*: modelo de *Eisenia Fetida*

Entre alguns invertebrados, a capacidade de regenerar partes do corpo perdidas são muito bem desenvolvidas como é o caso das minhocas que sobrevivem a bilhões de anos, talvez em parte devido às suas habilidades regenerativas (STURZENBAUM et al., 2004). Nestes animais, a regeneração ocorre através de um processo de desdiferenciação, em que as células reverterem para um estado indiferenciado antes da reprogramação celular para formar novos tecidos (MYOHARA et al., 1999; PEARSON, 2001). Em *E. fetida* já foram identificados genes pluripotentes que são expressos em um padrão específico durante a regeneração.

Deste modo, o presente estudo foi conduzido a partir da extirpação da extremidade caudal da minhoca adulta clitelada (~1 cm) e análise do padrão

regenerativo após 7 dias. O protocolo utilizado foi similar ao descrito por Tao et al (2018), que é descrito a seguir.

Minhocas californianas foram comercialmente adquiridas para a realização dos experimentos. As mesmas foram deixadas durante 10 dias para aclimação em condições laboratoriais, onde foram mantidas em 50% de terra e 50% de humus comercialmente adquirida. A este substrato foi adicionado 5% de esterco seco como fonte de nutrientes para as minhocas. O substrato foi mantido a 60% de umidade, pH 7.2-7.6, em recipiente escuro fechado, temperatura média de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12:12 h.

Para a realização do experimento as minhocas foram tratadas apenas com água (controle negativo hidrofílico), óleo mineral (controle negativo lipofílico), com a emulsão sem a adição do ACG e com a emulsão adicionada do produto ACG. A melhor concentração (aquele que apresentou os resultados mais positivos nos parâmetros avaliados) do produto identificada no estudo *in vitro* foi utilizada para a realização deste protocolo. O delineamento experimental dos tratamentos foi conduzido com a colocação de 5 minhocas em cada tratamento com repetição de três vezes. Para a realização da incisão cirúrgica na região caudal as seguintes etapas foram realizadas e apresentadas na Figura 12.

(1) As minhocas foram retiradas da terra e lavadas com água filtrada em abundância. A seguir as minhocas foram levemente secas utilizando toalhas de papel;

(2) Logo após, elas foram mergulhadas (~10 segundos) em uma solução de álcool etílico 10% disposta em uma placa de Petri, que auxiliou na assepsia dos animais e também para produzir reação exotérmica que potencializa o resfriamento corporal e paralisia temporária;

(3) Logo a seguir, as minhocas foram transferidas para uma Placa de Petri com água congelada para finalizar o processo de crioanestesia;

(4) Este processo faz com que a minhoca não se enrole e fique imobilizada permitindo assim a incisão cirúrgica caudal (últimos 5 segmentos) com o auxílio de um bisturi;

(5) Logo após, a incisão cirúrgica caudal, 2 μl do óleo bifásico ou 2 μg de emulsão foram colocados na ferida com o auxílio de uma pipeta ou pincel;

(6) A seguir, as minhocas foram transferidas para recipientes com terra e colocadas nas mesmas condições anteriormente descritas;

(7) A área da incisão de cada minhoca foi fotografada utilizando uma lupa com sistema de foto integrado da marca Leica®.

(8) Após 7 dias, foram observadas as seguintes características: (1) ocorrência de regeneração; (2) coloração da área regenerada, já que quanto mais rápido for o processo os segmentos ficam mais escuros e definidos um em relação aos outros; (3) presença de segmentos indicando regeneração de órgãos e não só do tecido externo (pele); (4) presença de vascularização na área regenerada.

Figura 12- Processo de tratamento das minhocas. A- Processo anestésico utilizando gelo, B- Corte, C- Tratamento, D- animais permaneceram por 2 horas em placas em contato direto com os respectivos tratamentos em seguida as minhocas foram transferidas para terra em condições apropriadas de umidade e nutrição onde permaneceram por 7 dias até serem avaliadas.



Fonte: Do autor

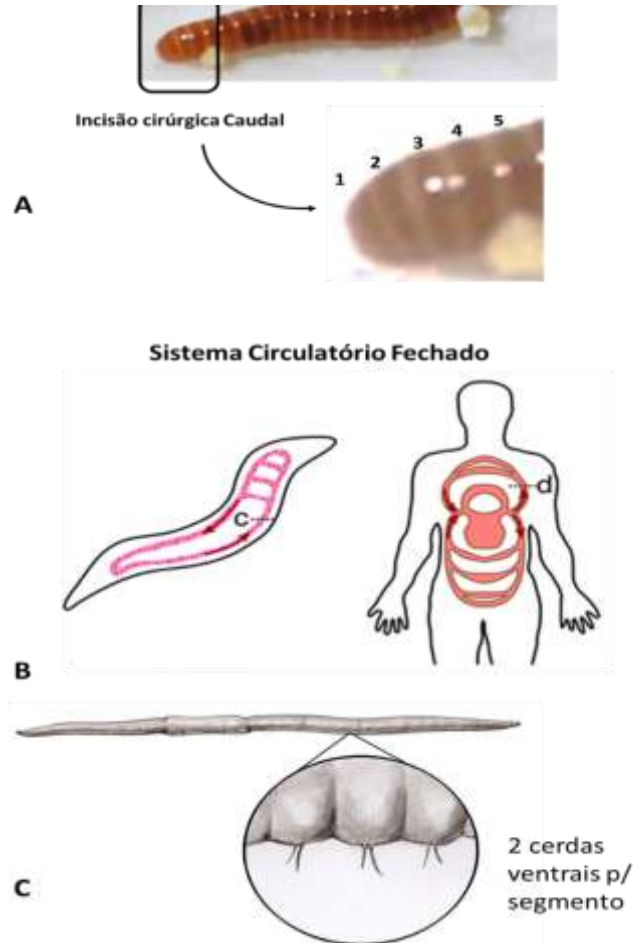
3.6.1 Análise do efeito do óleo ACG em marcadores de qualidade da regeneração tecidual em *Eisenia fetida*

Como a minhoca é um animal com grande capacidade regenerativa, estudos averiguando o quanto determinados produtos naturais ou farmacológicos podem influenciar tal processo, são de grande relevância. Estas análises podem ser feitas baseadas apenas na morfologia externa da minhoca investigando a taxa de regeneração e a qualidade da mesma. No presente estudo, estes indicadores foram avaliados.

Para tanto, inicialmente a Figura 13 destaca-se as principais características comparadas entre os tratamentos e as minhocas controle. A Figura 13A destaca o aspecto geral dos 05 últimos segmentos caudais que são retirados por incisão cirúrgica. Na minhoca íntegra pode ser observado uma clara separação entre os segmentos feita por faixas escuras (mais largas) e faixas claras (mais finas). Quando esta se mostra contraída, as partes claras ficam praticamente não visíveis, tornando-se muitas vezes, difícil a distinção das faixas.

A Figura 13B apresenta um esquema geral do sistema circulatório da minhoca que é fechado igual ao dos seres humanos. Na minhoca existe um grande vaso dorsal e um grande vaso ventral que se ramifica em capilares. Estes vasos precisarão ser regenerados após a incisão cirúrgica. A diferença maior entre minhocas e seres humanos em relação ao sistema circulatório é que a minhoca apresenta nos segmentos anteriores (cefálicos) um conjunto de três bombas vasculares maiores e duas bombas vasculares menores, que são consideradas os “corações da minhoca”. Já o ser humano possui apenas um coração. Em relação aos vasos sanguíneos, as minhocas apresentam vasos sem endotélio enquanto que seres humanos possuem esta camada epitelial recobrimdo o interior dos mesmos.

Figura 13- Características morfológicas analisadas e comparadas entre minhocas submetidas à incisão cirúrgica caudal. Tal processo ocorreu nos últimos 5 segmentos e subsequente tratamento com óleo ACG na apresentação de óleo bifásico ou emulsão: reorganização geral dos segmentos e proporcionalidade em relação aos demais segmentos não excisados, mielinização dos segmentos, presença de cerdas ventrais, angiogênese dos grandes vasos, outras alterações pertinentes



Fonte: Fotos tiradas pelo autor, e imagens disponíveis em:

< https://www.biologyjunction.com/earthworm_dissection.htm>. Adaptado pelo autor desta dissertação.

A observação visual da presença de grandes vasos sanguíneos na parte caudal regenerada também foi observada neste estudo. Outra característica anatômica que a minhoca possui diz respeito à presença de duas cerdas em cada segmento que auxilia na locomoção e escavação do animal. Estas cerdas estão localizadas apenas na região ventral da minhoca.

Além destas características, a manutenção da proporcionalidade em termos de largura dos segmentos regenerados em relação aos demais segmentos corporais foi comparada entre os tratamentos e os controles. A regeneração mais afilada do último segmento caudal também foi considerada na análise.

3.6.2 Análise do efeito do óleo ACG na modulação da expressão do gene embrionário SOX-4 em *Eisenia fetida*

Após 24 horas as minhocas foram fotografadas, sacrificadas e o segmento regenerado e/ou em regeneração foi cortado para análise da expressão do gene SOX-4, que de acordo com Bhambri et al., (2017) o tecido de regeneração tem genes reguladores que coordenam tal processo como é o caso do SOX-4.

Além desta análise, um segundo protocolo foi realizado para avaliar o efeito do produto ACG sob a forma de óleo bifásico na modulação da expressão do gene SOX-4. Este protocolo foi conduzido a partir da execução utilizando o ensaio do papel filtro que é padronizado e publicado pela OECD em estudos toxicológicos envolvendo minhocas.

- (1) Uma solução contendo o produto ACG (10 µL) em álcool etílico 92% foi obtida. Uma solução similar contendo apenas óleo mineral foi também produzida;
- (2) A seguir estas soluções foram utilizadas para umedecer papéis filtros (90 mm x 10 mm) dispostos em bandejas. O excesso da solução foi retirado após os papéis ficaram 100% umedecidos;
- (3) Após a evaporação do álcool e a secagem completa dos papéis os mesmos foram utilizados para a realização dos testes;
- (4) No fundo das Placas de Petri foi colocado um papel filtro previamente tratado como anteriormente descrito;
- (5) Minhocas cliteladas foram coletadas e lavadas em água abundante para retirar o excesso de terra;
- (6) O excesso de água foi retirado enxugando-se levemente as minhocas em um papel filtro;
- (7) A seguir as minhocas foram anestesiadas. Este procedimento foi feito um a um - de modo individual -. Com um auxílio de uma pinça as mesmas foram rapidamente mergulhadas em uma solução de álcool 20% e repassadas

para uma placa de Petri contendo gelo (a água foi previamente congelada dentro da Placa). Como o álcool induz uma reação exotérmica este procedimento leva a uma paralisia temporária das minhocas em decorrência da baixa temperatura.

- (8) Assim que uma dada minhoca foi anestesiada, a mesma foi disposta sobre uma Placa de Petri invertida recoberta com parafilme e observada na lupa. Após ajustar a minhoca e garantir visibilidade, os últimos 4 segmentos foram contados e foi feita uma incisão cirúrgica entre o 4º e o 5º segmento;
- (9) A seguir a minhoca foi transferida para a Placa de Petri contendo o papel filtro previamente tratado;
- (10) Após a repetição deste procedimento em três minhocas dispostas na mesma placa de Petri, esta placa foi recoberta com outro papel filtro previamente tratado.
- (11) A seguir foi adicionado 1 mL de meio de balanço eletrolítico para minhocas (LBBS) com adição de 1% de glicose para garantir que as mesmas permanecessem hidratadas e nutridas.
- (12) Este procedimento foi repetido para as minhocas controles, tratadas com óleo mineral e tratadas com o produto ACG.
- (13) Após 24 horas do procedimento cirúrgico, foi realizada eutanásia rápida das minhocas a partir da imersão das mesmas em álcool 70% e, feita uma nova incisão cirúrgica entre o 5º e o 7º segmentos. Este tecido foi então processado em trizol para extração do RNA e análise da expressão gênica foi realizada conforme descrito anteriormente por Barbisan e colaboradores (2014), em processo de extração idêntico ao utilizado em cultura de células.

3.7 Análises Estatísticas

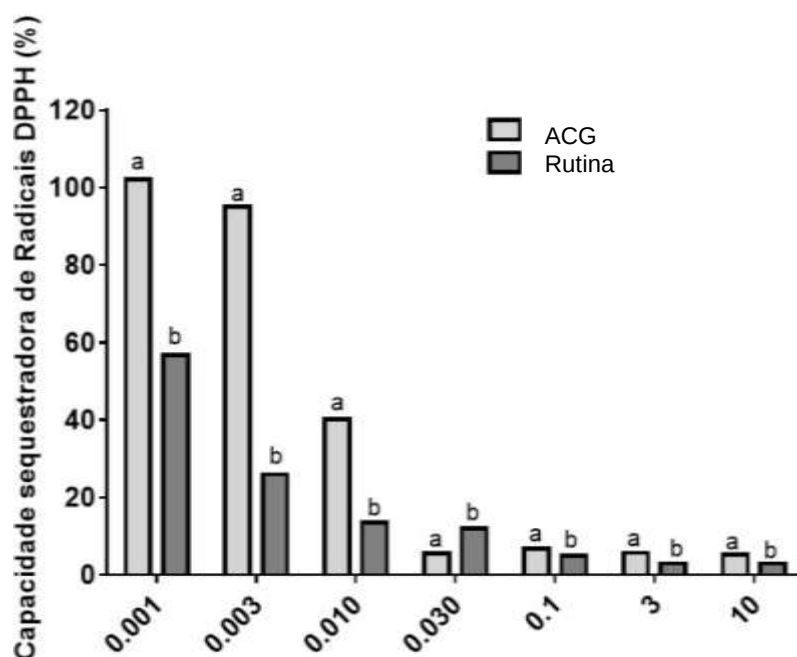
Todos os testes *in vitro* e *in vivo* foram realizados em triplicata. Os valores obtidos apresentados como percentual em relação ao valor do controle negativo (sem nenhum tratamento). Os resultados apresentados sob a forma de média $\pm$ desvio padrão (DP) ou erro padrão (EP). A comparação entre os tratamentos foi feita por análise de variância (uma ou duas vias, conforme for o caso) seguida de testes post hoc de Dunnet, Tukey ou Bonferroni (conforme for o caso) e o Software utilizado para a análise estatística foi o Graph Pad Prism versão 5.0. As análises das áreas regeneradas da minhoca foram feitas a partir de observação visual e também de avaliação das áreas via pacote de software de análise de imagem Digimizer (versão 5.3.5, modificado pela última vez: janeiro de 2019, MedCalc Software, Bélgica) que permite medições manuais, bem como, detecção automática de objetos com medições de características de objetos. Considerando que o tamanho médio do perímetro de regeneração é variável a comparação entre os grupos de tratamento foi feita através das medianas por meio da análise não paramétrica de Kruskal-Wallis. Todos os valores de p foram bicaudais. O valor alfa foi definido para $<0,05$ para determinar a relevância estatística.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização do extrato bifásico ACG

A capacidade antioxidante do produto ACG foi avaliada em comparação do polifenol rutina utilizado como molécula de referência e também em relação ao óleo de andiroba, copaíba e extrato aquoso de guaraná. Os resultados mostraram que o produto ACG apresentou maior capacidade antioxidante do que os óleos puros e o pó extrato aquoso de guaraná quando estes foram analisados isoladamente. A capacidade antioxidante do produto foi mais próxima à observada na rutina, ainda que significativamente mais baixa (Figura 14).

Figura 14- Capacidade antioxidante do ACG, analisada via teste DPPH.

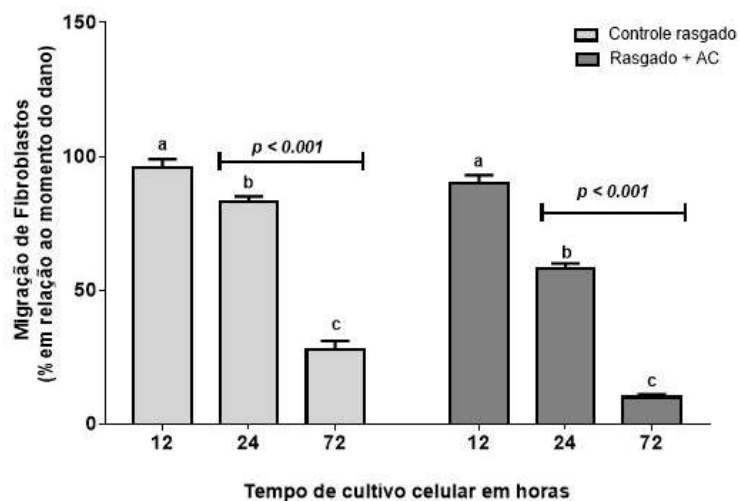
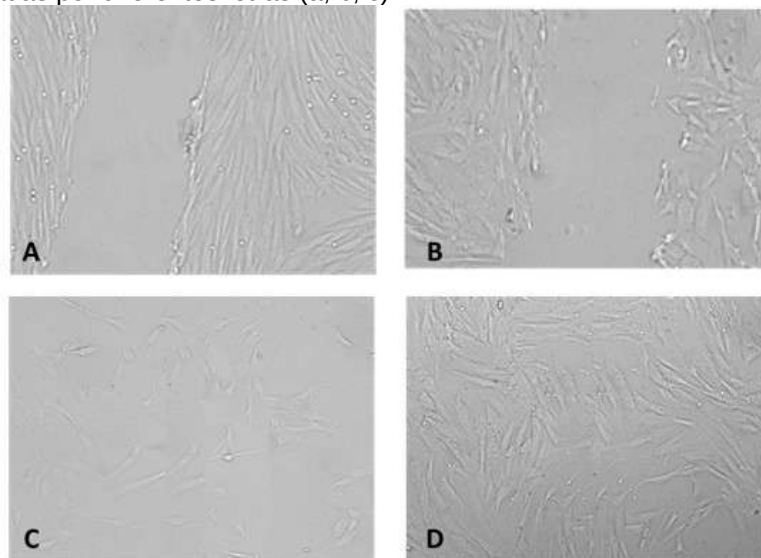


A capacidade genoprotetora também foi avaliada, os resultados foram similares aos observados na capacidade antioxidante. A análise destes resultados possibilitou a escolha da faixa de concentração a ser testada nos fibroblastos que foi de 0,1; 0,3 0,5; 1,0 e 2,0 $\mu\text{L/mL}$. A concentração de 1 $\mu\text{L/mL}$ do produto ACG não ocasionou mortalidade em culturas de 24 h e, ao contrário aumentou significativamente a viabilidade em relação ao grupo controle ($114.5 \pm 2.3 \%$ ($p \leq 0.001$)).

Com base nestes resultados iniciais a concentração do produto ACG 2 $\mu\text{L/mL}$ foi escolhida para a realização dos testes adicionais de análise do potencial efeito cicatrizante do produto.

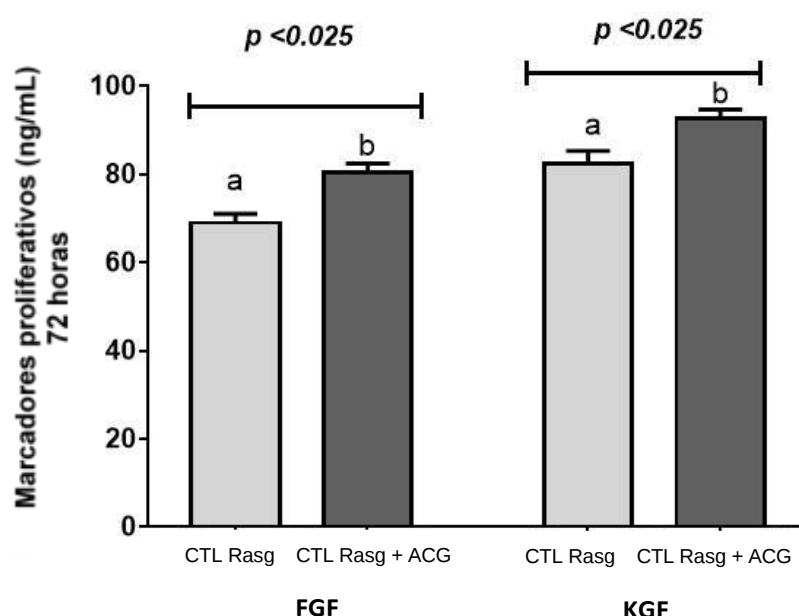
O “*Strach assay*” foi então realizado nos fibroblastos, e conforme se pode observar na figura 15, o tratamento com o ACG foi capaz de induzir maior taxa de migração de fibroblastos quando comparadas as células rasgadas e não tratadas.

Figura 15- Análise da migração de fibroblastos utilizando o ensaio *in vitro* Strach (A) área rasgada de cultura de fibroblastos; (B) migração de fibroblastos após 12 h de rasgo de cultura de fibroblastos; (C) migração de fibroblastos após 24 horas em cultura não tratada; (D) migração de fibroblastos em células tratadas AC após às 24 h. (E) Migração de fibroblastos do ensaio de cicatrização de feridas por rasgo expresso como migração celular relativa calculada dividindo a alteração percentual na área rasgada das células tratadas com ACG por 12 h, 24 h ou 72 h na área riscada às 0 h em cada tratamento. Controle (C); O período de tempo de cada tratamento para “curar a ferida” foi comparado por análise de variância One-Way seguida por teste post hoc de Tukey. Diferenças estatisticamente significativas são denotadas por diferentes letras (a, b, c).



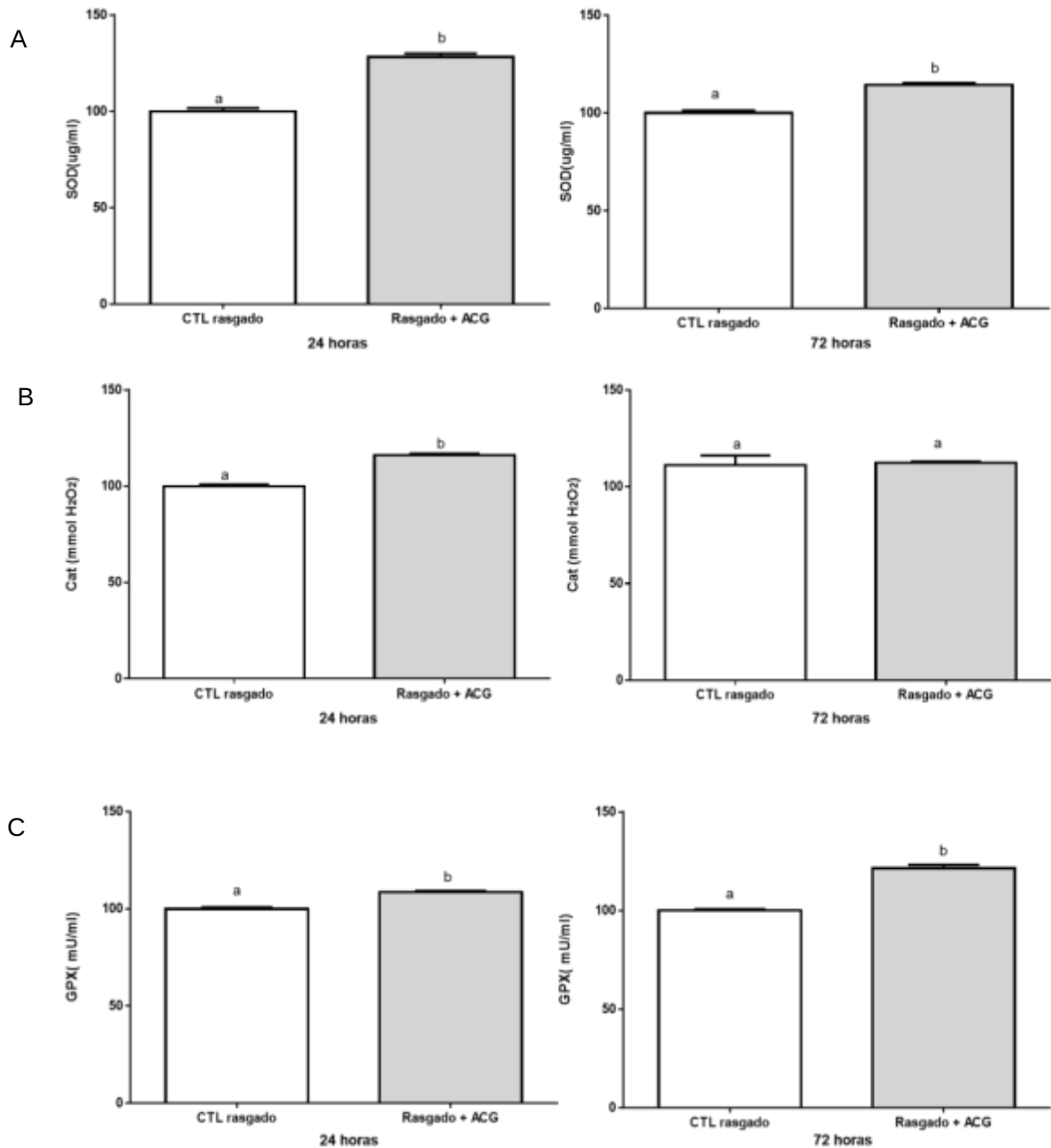
Em culturas de 72 h de fibroblastos rasgados e não rasgados foram analisados os níveis de dois marcadores de proliferação celular: FGF e KGF (Figura 16), em ambos os casos o tratamento com ACG elevou os níveis proteicos destas proteínas pró- proliferação celular.

Figura 16: Marcadores proliferativos FGF (Fator de Crescimento de Fibroblastos) e de KGF (Fator de Crescimento de Queratinócitos). Comparação entre controle rasgado sem tratamento e rasgado com ACG. Os dados são apresentados como valores médios $\pm$ erro padrão e expressos como porcentagem do valor de controle rasgado. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre o controle e o ACG pela análise ANOVA unidirecional seguida do teste post hoc de Tukey com $p < 0,05$.



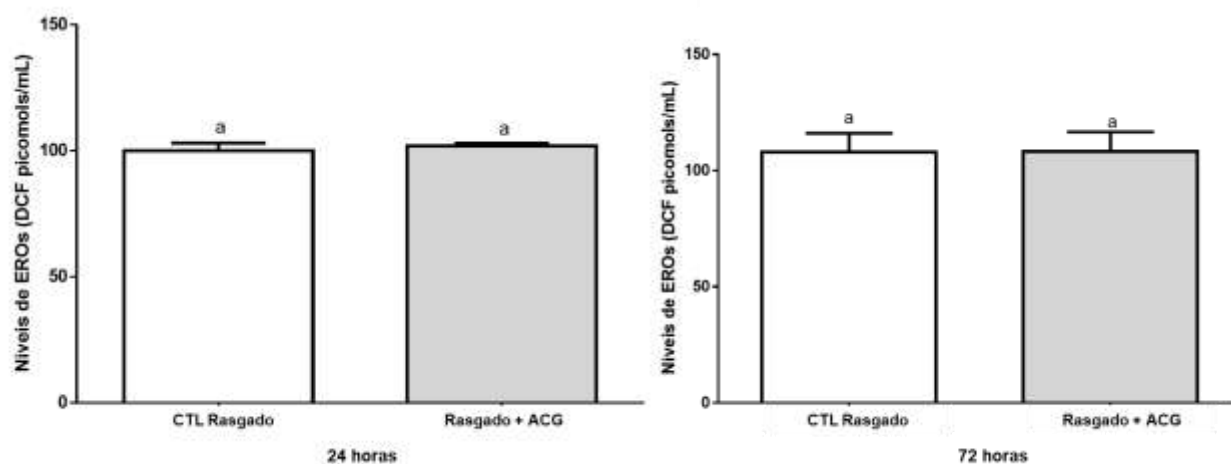
A análise dos marcadores oxidativo incluiu os níveis proteicos das enzimas antioxidantes Superóxido dismutase, Catalase e glutathione peroxidase, cujos os respectivos resultados após 24 e 72 horas de exposição ao ACG são apresentados na Figura 17.

Figura 17- Níveis das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathiona Peroxidase (GPX). Na figura A: níveis proteicos da Superóxido Dismutase, na figura B: níveis proteicos da Catalase, na figura C: níveis proteicos da Glutathiona Peroxidase, são apresentados os resultados comparando os níveis de cada enzima em células rasgadas sem tratamento e com tratamento após 24 e 72 horas. Os dados são apresentados como valores médios $\pm$ erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre o controle e o ACG pela análise ANOVA unidirecional seguida do teste post hoc de Tukey com $p < 0,05$



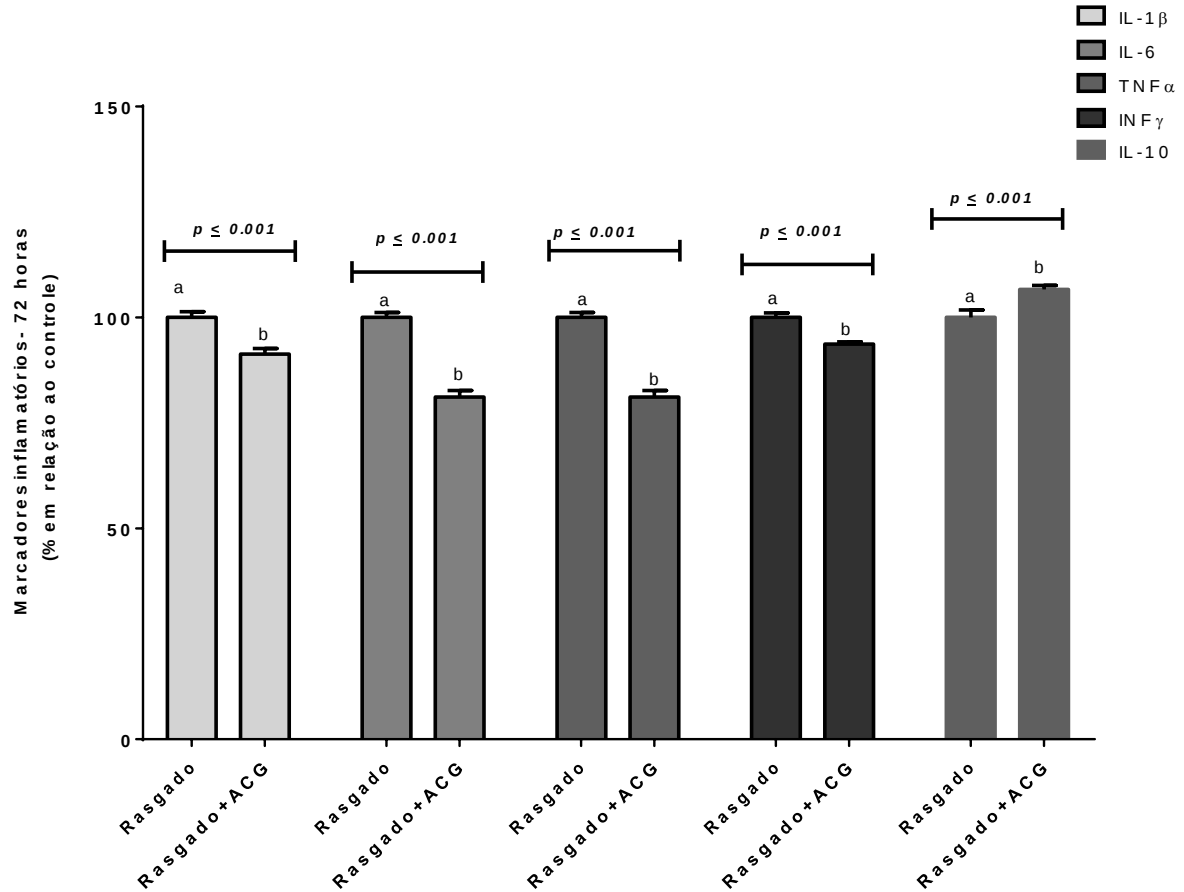
Também foi realizada a análise dos níveis de EROs após 24 e 72 horas de tratamento das células rasgadas, entretanto nesta análise não observamos diferença significativa entre células tratadas e não-tratadas.

Figura 18: Níveis de Espécies Reativas de Oxigênio. Após 24 e 72 horas de tratamento com ACG. Os dados são apresentados como valores médios $\pm$ erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre o controle e o ACG pela análise ANOVA unidirecional seguida do teste *post hoc* de Tukey com $p < 0,05$.



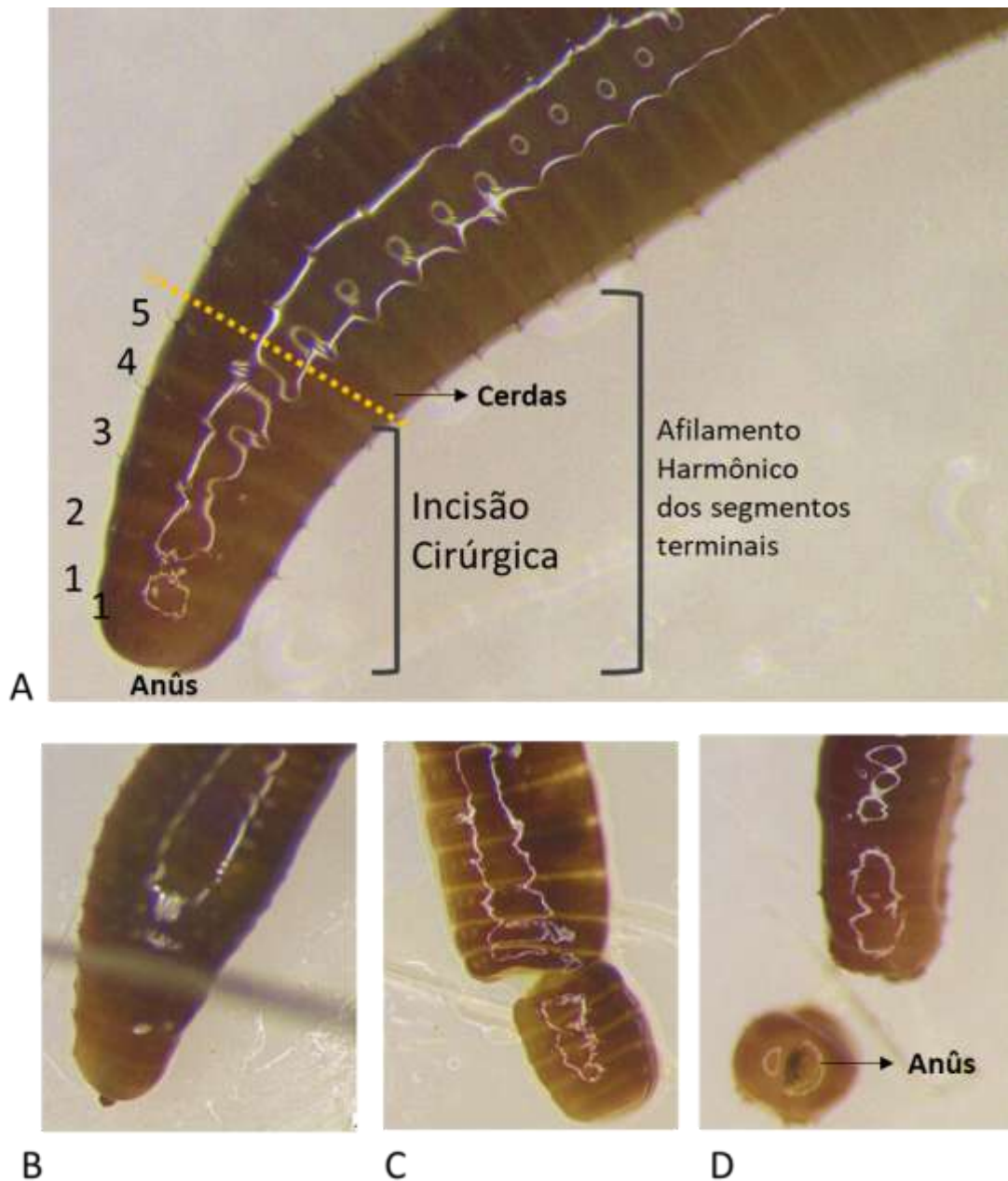
Após 72 horas de tratamento com o composto ACG, também foram avaliados os níveis das citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ e da IL-10 que é anti-inflamatória. E novamente, o composto ACG mostrou-se pró-cicatrização, modulando atividade anti-inflamatória diminuindo os níveis das citocinas pró-inflamação, ao mesmo tempo que eleva os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10, em comparação com as células não tratadas (Figura 19).

Figura 19: Marcadores do metabolismo inflamatório dos fibroblastos HFF-1 rasgados. A exposição ao composto ACG diminuiu todas as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ) e aumentou a citocina anti-inflamatória (IL-10). Os dados são apresentados como valores médios $\pm$ erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre o controle e o ACG pela análise ANOVA unidirecional seguida do teste post hoc de Tukey com $p < 0,05$.



O efeito do óleo bifásico ACG sobre a regeneração da região caudal das minhocas submetidas à incisão cirúrgica foi avaliado. A Figura 20 apresenta ilustração do processo de incisão cirúrgica realizado nas minhocas.

Figura 20 - Principais etapas da incisão cirúrgica em minhocas. (A) Minhoca com a parte posterior íntegra, destacando os 05 segmentos que foram cirurgicamente retirados. A foto também mostra ocorrência de afilamento harmônico dos últimos segmentos em relação à parte anterior da minhoca. As cerdas presentes em cada segmento também são identificadas. (B) Incisão cirúrgica com bisturi dos 4 segmentos; (C) detalhe da separação dos segmentos do restante do corpo; (D) incisão completamente finalizada.

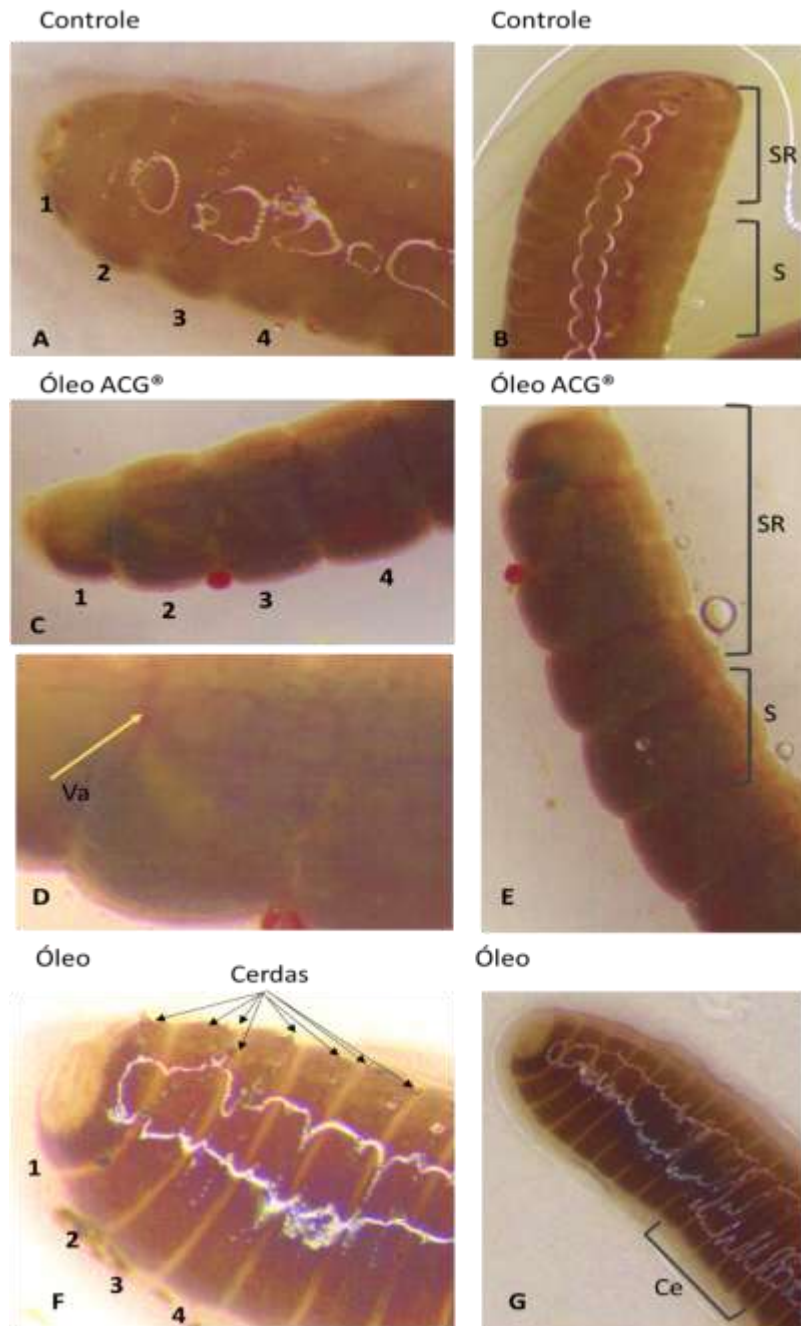


O produto ACG foi testado considerando duas formas de apresentação farmacológica, oleoso/aquosa (óleo bifásico) e sob a forma de uma emulsão. Como pode ser observado na Figura 21A, após sete dias da incisão cirúrgica as minhocas controles apresentavam uma regeneração parcialmente completa, com cerdas nascentes, segmentos em fase inicial de mielinização e separação em faixas claras e

escuras. Os vasos sanguíneos maiores ainda eram finos e de baixa visibilidade. A proporção dos segmentos regenerados em relação aos demais estava mantida (Figura 21B) ainda que o segmento final não estivesse mais afilado do que os demais. Na presença do óleo bifásico ACG a regeneração se apresentou de modo completo, com segmentos escuros e claros bem definidos, presença de cerdas na região ventral (Figura 21C). A vascularização da região regenerada também estava visível e dentro do padrão morfológico esperado (Figura 21D). Os segmentos regenerados apresentaram proporcionalidade em relação aos segmentos remanescentes e o último segmento já possuía aspecto mais afilado como se é observado na minhoca não cortada (Figura 20E). Quando as minhocas foram tratadas apenas com óleo mineral, os segmentos apresentaram uma hiper - mielinização e presença de pares extras de cerdas na região dorsal no 1º segmento, entre o 2º e 3º segmentos.

Dois pares de cerdas adicionais na região dorsal do 5º segmento também foram identificados sugerindo que o óleo mineral também induziu alterações morfológicas neste segmento que não foi retirado, mas que se apresentava lesionado em decorrência da incisão cirúrgica. Cerdas ventrais continuaram sendo observados nas minhocas tratadas com óleo, nos segmentos que não foram cirurgicamente retirados (Figura 21E). Porém, o tratamento com óleo mineral não induziu alterações nas proporções dos segmentos regenerados em relação aos demais. Afilamento do primeiro segmento também foi observado nestas minhocas, indicando regeneração completa da área extirpada cirurgicamente.

Figura 21- Comparação das áreas regeneradas. Entre minhocas controle negativo (sem tratamento), tratadas com o óleo bifásico ACG (produzido a partir de andiroba, copaíba e extrato aquoso de pó de guaraná e óleo mineral (controle positivo)). SR= segmento regenerado; S= demais segmentos.

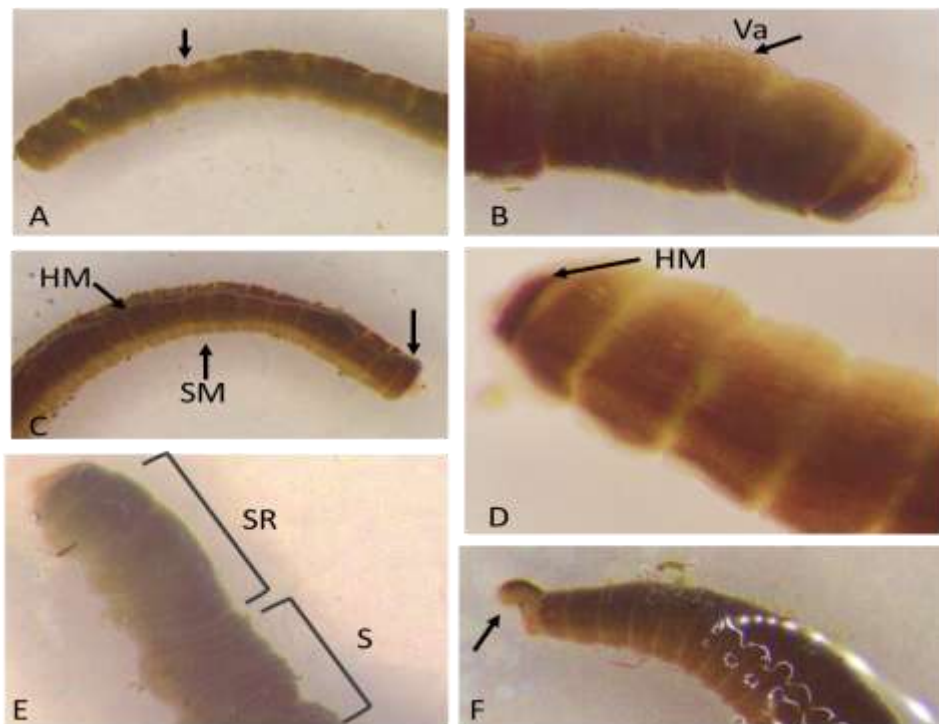


Ao contrário do aparente efeito benéfico na qualidade da regeneração caudal das minhocas, a emulsão, com ou sem a presença do produto ACG causou extensivas alterações neste processo. As principais alterações detectadas são representadas por fotografias na Figura 22.

Entre estas, salientam-se: (1) alterações nas proporções (larguras) entre os segmentos regenerados e os demais ocorrendo muitas vezes desorganização

morfológica clara, com alterações nas regiões convexas que deveriam ser observadas principalmente na região dorsal (Figura 22A-21E); (2) alterações no primeiro segmento anal que muitas vezes não apresentou o afilamento usual (Figuras 22B, 22C), apresentou-se hipermielinizado em relação aos outros segmentos regenerados (Figura 21D) e formato bilobulado (Figura 22F); (3) ocorrência de alterações no padrão da angiogênese com vasos sanguíneos dispostos fora do padrão usual (Figura 22B); (4) ocorrência de mielinização heterogênea, com hipermielinização na região dorsal (HM) e sem mielinização na região ventral (SM) (Figura 22C).

Figura 22- Representação das principais alterações observadas em minhocas submetidas à incisão cirúrgica da região posterior (anal) e tratadas com emulsão (com e sem o produto ACG). SR= segmento regenerado; S= segmentos; Va= vasos sanguíneos; HM= hipermielinização; SM= sem mielinização.



Com base nestes resultados foi conduzida uma análise complementar apenas com o óleo bifásico ACG no qual foi avaliado o efeito do mesmo na modulação da expressão de três genes relacionados à regeneração tecidual. Estes três genes que estão ativos em células-tronco embrionários são reativados na minhoca, quando ocorre perda de uma parte da região corporal. Esta reativação permite então a diferenciação dos tecidos e órgãos perdidos.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o possível efeito em marcadores do processo de cicatrização, de um novo produto produzido a partir de três plantas amazônicas: andiroba, copaíba e guaraná. O referido produto (ACG) desenvolvido e submetido a patente por Maia-Ribeiro et al (2019) com o objetivo inicial de melhorar a qualidade da derme. Tanto no modelo *in vitro* quanto *in vivo* os resultados sugeriram que o produto poderia ter efeitos benéficos de interesse para a área cirurgica. Os mesmos são discutidos a seguir.

No modelo *in vitro*, o ACG apresentou potencial efeito benéfico no processo de migração de fibroblastos, na diminuição de marcadores oxidativos e na modulação de marcadores inflamatórios. Já no modelo *in vivo*, apesar do produto não acelerar o processo de cicatrização em relação ao grupo controle, os marcadores de regeneração indicaram ação benéfica do produto. Isto porque, a segmentação estava bem definida, a queratinização e mielinização indicada pelo escurecimento do local regenerado era mais intensa, e a presença de formação de novos vasos sanguíneos também estava mais acentuada em relação ao controle. Entretanto, é importante destacar que em relação as duas formas de apresentação do produto que foram aqui testadas em minhocas, o óleo bifásico apresentou maior eficácia e menor taxa de distúrbios na regeneração do que a emulsão. Esta diferença entre os resultados das duas apresentações será posteriormente discutida.

Os resultados *in vitro* indicaram que o produto apresentou efeito na velocidade de migração dos fibroblastos para o local do corte, e também nos marcadores oxidativos, inflamatórios e de proliferação celular. Estes resultados possivelmente estão associados às propriedades individuais das plantas componentes do ACG. De fato, tratamentos alternativos usando plantas medicinais têm sido utilizados na medicina tradicional. Este é o caso da andiroba, cujas propriedades anti-inflamatórias parecem depender da presença de limonóides. Além disto, estudos têm sugerido que a andiroba apresenta efeitos inibitórios sobre as ações da histamina, da bradicinina e do fator ativador de plaquetas (PENIDO et al., 2006; HENRIQUES E PENIDO, 2014; BURLANDO E CORNARA, 2017).

Em um estudo conduzido Chia et al (2018) em ratos no qual foram feitas incisões, o tratamento tópico com emulsão a base de andiroba foi testado. Os resultados mostraram que as feridas tratadas foram menores, contraíram

anteriormente e aumentaram a angiogênese. Os autores também descreveram um importante papel anti-inflamatório do tratamento com andiroba e a modulação associada de macrófagos, miofibroblastos e níveis de TGF β 3. As fibras de colágeno nas feridas tratadas também foram mais organizadas e menos densas, semelhantes à pele não ferida, o que provavelmente contribuiu para a maior resistência à tração. Como as minhocas tratadas com o óleo apresentaram maior organização dos segmentos caudais em relação ao controle, é possível que este resultado tenha sido especialmente influenciado pela andiroba. A andiroba também possivelmente contribui para uma modulação dos marcadores inflamatórios induzida pela presença do óleo bifásico ACG.

A copaíba é uma planta tradicionalmente utilizada em processos de cicatrização de lesões cutâneas e mucosas (RICARDO et al., 2018). Estudos tem corroborado este efeito, como é o caso da investigação conduzida por Feitosa et al (2018) que descreveu eficiência no processo de cicatrização de bexigas de ratos. Wagner et al (2017) também relataram ação cicatrizante em feridas orais conduzida pela copaíba. Entretanto, outra investigação realizada por Martini et al (2016) e publicada na Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgia sugeriu que apesar do óleo de copaíba influenciar positivamente o processo de cicatrização ele foi menos efetivo do que a nitrofurazona na cicatrização por segunda intenção de incisões realizadas em ratos. Infelizmente estudos sobre mecanismos causais do óleo de copaíba sobre a cicatrização ainda são bastante incipientes. De todo modo, é possível que o óleo de copaíba também contribua para a eficiência nos marcadores de cicatrização testados no modelo *in vitro*.

Em relação aos resultados obtidos nas minhocas, é importante realizar inicialmente algumas considerações sobre as diferenças de resultados obtidas entre o óleo bifásico e a emulsão. No caso, enquanto o óleo bifásico apresentou maior eficácia e menor taxa de distúrbios na regeneração, minhocas expostas à emulsão apresentaram distúrbios claros no processo regenerativo. Porém, vale ressaltar que as alterações no processo regenerativo observadas na emulsão parecem ter sido provocadas pelos incipientes da mesma, e não pelo produto aqui testado. É possível que este fato esteja relacionado com a biologia da pele da minhoca que possui algumas diferenças em relação à pele dos seres humanos.

A pele e o sistema respiratório da minhoca têm uma interação íntima, já que as minhocas possuem uma respiração tegumentar ou cutânea, não existindo sistema

respiratório específico. Dentro deste contexto é importante conhecer melhor a estrutura da pele. Na região mais externa existe uma cutícula de quitina que é secretada pela epiderme que se encontra logo abaixo e confere a minhoca um brilho iridescente.

A epiderme é composta por uma única camada de célula epitelial colunar no qual se encontram também células mucosas que ficam secretando constantemente muco, que recobre o corpo externo do animal. O muco tem função relevante para a minhoca já que facilita a sua aderência no meio facilitando assim a sua locomoção. Além disto, o muco garante a umidade necessária para que as trocas respiratórias entre oxigênio e gás carbônico ocorram com maior eficiência. A respiração da minhoca ocorre por gradiente de difusão (onde o oxigênio se desloca para o local em que está menor concentração e o gás carbônico faz o caminho inverso). Para tanto, estes gases deverão atravessar as camadas que estão abaixo e subjacentes à epiderme a fim de chegarem até a rede de vasos sanguíneos. Este consiste de dois vasos sanguíneos principais que percorrem todo o corpo do animal. Posteriormente serão comentados aprofundadamente as principais características do sistema circulatório das minhocas. Assim, é possível que a emulsão tenha diminuído e tenha ocasionado algum nível de obstrução no local em que ocorreu a incisão impedindo assim trocas gasosas eficientes (VELKI E, EČIMOVIĆ, 2017).

O corpo da minhoca possui tecido muscular organizado em dois grandes grupos: músculo circular e longitudinal. Diferente do tecido epidérmico dos mamíferos, a epiderme secreta uma membrana basal que se liga difetamente ao tecido muscular circular, e após o tecido muscular longitudinal. Ou seja, na minhoca não se encontra um tecido conjutivo bem estruturado. Entremeado nestes tecidos existem diversos capilares sanguíneos que facilitam a difusão do oxigênio e gás carbônico durante a respiração.

Outra possível explicação, diz respeito ao próprio sistema imune da minhoca. As minhocas são animais celomados, ou seja, apresentam cavidades corporais semelhantes à cavidade peritoneal humana. Esta cavidade está cheia de um fluído (líquido) celômico, que tem como função a manutenção da pressão hidrostática, defesa (contém uma boa parte de células imunes com funções similares a macrófagos (fagócitos) e a granulócitos, faz a distribuição de nutrientes ao longo do corpo, e auxilia na excreção de resíduos e metabólitos, já que na cavidade celômica encontram-se túbulos (metanefrídios) que fazem o papel do sistema excretor. O celoma da minhoca

é dividido em septos assim que, quando ocorre à extrusão celômica este processo não ocorre de modo uniforme em todo o corpo da minhoca. Está consolidado na literatura que minhocas são consideradas um modelo ideal para o estudo da evolução celular das respostas imunes mediadas pelos seus leucócitos (celomócitos). Estes organismos possuem sistema imune inato (humoral = inflamatório) e também adaptativo (incluindo resposta à rejeição de tecidos e órgãos) (COOPER, 1999).

Além dos leucócitos da minhoca apresentarem funções similares aos leucócitos humanos, como as minhocas ficam ingerindo constantemente terra elas possuem outro processo que auxilia a limpeza do líquido celômico que acaba se enchendo de impurezas incluindo resíduos inorgânicos e microorganismos. Este processo se denomina encapsulamento, onde células semelhantes aos granulócitos envolvem estes materiais e destroem os mesmos, os aprisionam. Este processo finaliza quando as células das bordas perdem a adesividade e as células que fazem parte do encapsulamento produzem grande quantidade de melanina formando estruturas chamadas de “corpos marrons” (Figura 23). Segundo o estudo de Valembois et al (1992)¹ “a formação de corpos marrons na cavidade celômica pode ser consequência de uma agressão de celomócitos em torno de células estranhas ofensivas, como bactérias, gregarinas, fragmentos de enxertos incompatíveis e auto-estruturas alteradas, como cerdas ou células musculares necróticas”.

Estes corpos marrons são expelidos do interior das minhocas por um processo chamado “extrusão celômica” que libera os mesmos e também outras células leucocitárias para o exterior do corpo das minhocas via poros presentes no tegumento destes organismos. Além disto, foi previamente descrito que quando parte de uma minhoca é cortada, glóbulos brancos se acumulam na superfície de corte para formar um bloqueio que faz com que a ferida se feche rapidamente. Dois dias depois, uma estrutura visível pode ser observada no ponto de lesão. Esta estrutura é denominada “blastema” (CHO et al., 2009). Ressecções da porção posterior da minhoca regeneram mais rapidamente que as ressecções da porção anterior (Qi et al., 2004).

Pois bem, é possível que o efeito negativo da emulsão nas minhocas tenha ocorrido pelo fato de as mesmas obstruírem os poros impedindo a liberação dos

corpos marrons e do restante do celoma. Este processo poderia levar a uma “intoxicação e causar dano à regeneração”.

Assim, parece que o modelo experimental de minhocas possui uma limitação quando se trata de testar produtos sob a forma de emulsões. Por este motivo, estudos complementares deverão ser feitos em outros modelos para avaliar a eficácia entre o óleo bifásico e a emulsão. Existe também a possibilidade de desenvolvimento de novas formas de apresentação do produto, como é o caso da nanoformulação. Esta também deverá ser futuramente testada.

Figura 23- Microfotografia do celoma extrudado de minhoca destacando a presença de um corpo marrom.



Autor: Laboratório de Biogenômica (2019).

Outro conjunto de resultados importantes de serem discutidos versa sobre a modulação da expressão de alguns genes relacionados com a regeneração. A regeneração geralmente envolve a reativação de fatores reguladores do desenvolvimento que coordenam o crescimento e a diferenciação de fatores pluripotentes; Células progenitoras ou células-tronco (OZEKI et al., 2007). Ainda, relata-se que células especializadas podem ser des-diferenciadas e assim, transformadas em células-tronco, através da influência de fatores pluripotentes (YAMANAKA E TAKAHASHI, 2006).

Na minhoca existem cinco genes identificados com a regeneração da cauda, destacando o SOX 4 (ZHENG et al., 2016). Neste trabalho, ocorreu uma leve diferença na modulação da expressão deste gene entre as minhocas controle e as

minhocas tratadas, sendo que a elevação deste gene 1.5x em relação no tratamento com óleo ACG, é uma demonstração de efeito pró-cicatricial do produto via efeito na modulação de genes da regeneração tecidual.

Em síntese, apesar das limitações metodológicas associadas ao uso de modelos experimentais, o conjunto dos resultados indica que o produto ACG poderia melhorar a qualidade da regeneração tecidual e do processo cicatricial. Estudos adicionais precisam agora ser conduzidos em ratos (ou similares) a fim de comparar a eficiência do ACG em relação a outros produtos já clinicamente utilizados. Como o uso de óleos pode afetar negativamente a cicatrização de incisões cirúrgicas de seres humanos estes estudos adicionais poderiam testar a eficácia do produto sob a forma de emulsões e géis.

6 CONCLUSÃO

Apesar das limitações metodológicas inerentes a trabalhos desenvolvidos *in vitro* e em modelos experimentais de não mamíferos, consideramos relevantes os

dados obtidos neste estudo uma vez que foi desenvolvido um novo produto aqui denominado ACG, que está em fase de registro de patente, todos os objetivos aos quais nos propomos foram respondidos sendo que os resultados iniciais mostram ação antioxidante, anti-inflamatória e pró-cicatrização do composto desenvolvido, mais estudos precisam ser desenvolvidos para comprovação dos resultados aqui obtidos, entretanto acreditamos que futuramente o desenvolvimento de um produto comercial com fins clínicos poderá ser uma realidade, beneficiando pacientes, profissionais de saúde e também as cadeias produtivas da Amazônia. Parte dos resultados desta dissertação farão parte do livro *A Closer Look at Fibroblasts* da editora americana Nova Science Publishers. Outra parte dos resultados está sendo utilizada para juntamente com os processos de extração fazer parte de uma patente.

REFERÊNCIAS

- ARAUJO-LIMA, C.F. et al. **Antioxidant Activity and Genotoxic Assessment of Crabwood (Andiroba, *Carapa guianensis* Aublet) Seed Oils.** *Med. Cell. Longev.* 2018. Disponível em: < <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2018/3246719/>>. Acesso em 03/05/2019.
- BAHMANPOUR, S.; TALAEI KHOZANI, T.; REZAEI TAZANGI, F. **Evaluation of the Capability of the Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell Aggregates to Express the Markers of Three Germ Cell Lineages.** *Arch. Iran. Med*, v. 22, n. 2, p.85-90, 2019. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30980644>>. Acesso em: 25/03/2019.
- BAHRAMSOLTANI, R.; FARZAEI, M.H.; RAHIMI, R. **Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: an integrative review.** *Arch. Dermatol. Res*, v. 306, n. 7, p. 601–17, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24895176>>. Acesso em 03/03/2019.
- BANOV, D.; BANOV, F.; BASSANI, A.S. **Case series: the effectiveness of Fatty acids from pracaxi oil in a topical silicone base for scar and wound therapy.** *Dermatol. Ther. (Heidelb)*, v. 4, n. 2, p.259-69, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25410612>>. Acesso em 04/04/2019.
- BAROUDI, R. **A Segurança nas Cirurgias Estéticas Combinadas - EDITORIAL.** *Rev. Bras. Cir. Plást. (Impr.)*, v 25. n. 4, 2010. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1983-51752010000400002>. Acesso em 03/05/2019.
- BARR, S.P et al. **Northwest Breast Surgical Research Collaborative.** *Eur. J. Surg. Oncol*, v. 42, n. 5, p.591-603, 2016. Disponível em: < <https://nwresearch.org/breast-subgroup/nwbrc-projects/>>. Acesso em: 05/07/2019.
- BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. **Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos.** *Quim. Nova*, v. 32, n. 3, p.679-88, 2009. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000300012>. Acesso em: 06/04/2019.
- BERGHOLZ, E. **Experiment on minimal segment size regeneration of *Lunbriculus variegatus*.** Disponível em: < www.woodrow.org/teachers/biology>. Acesso em: 08/06/2019.
- BERMAN, B.; MADERAL, A.; RAPHAEL, B. **Keloids and Hypertrophic Scars: Pathophysiology, Classification, and Treatment.** *Dermatol. Surg.*, v. 43, 2017. Disponível em: <https://journals.lww.com/dermatologicsurgery/Abstract/2017/01001/Keloids_and_Hypertrophic_Scars_Pathophysiology..2.aspx>. Acesso em: 08/05/2019.
- BHAMBRI, A. et al. **Large scale changes in the transcriptome of *Eisenia fetida* during regeneration.** *PLoS One*, v. 13, n. 9, 2018. Disponível em:

<<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0204234>>. Acesso em: 08/03/2019.

BRITO, N.B. et al. **Effects of andiroba (*Carapa guianensis*) oil on hepatic function of rats subjected to liver normothermic ischemia and reperfusion.** *Rev. Col. Bras. Cir.*, v. 40, n. 6, 476-79, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-69912013000600010&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 05/02/2019.

BROUGHTON, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. **The basic science of wound healing.** *Plast. Reconstr. Surg.*, v. 117, 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S026393190700316X>>. Acesso em: 08/01/2019.

CADONÁ, F. C. et al. **Genomodifier capacity assay: a non-cell test using dsDNA molecules to evaluate the genotoxic/genoprotective properties of chemical compounds.** *Anal Methods.*, v.6, n. 21, p. 8559–68, 2014. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/AY/c4ay01709a>> Acesso em: 12/12/2018.

CALIXTO, J.B.; SIQUEIRA, J.R. **Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios.** *Gaz. Méd. Bahia*, v. 78, p.98-106, 2008. Disponível em: <<http://www.gmbahia.ufba.br/index.php/gmbahia/article/view/269>>. Acesso em: 12/10/2018.

CHIA, C.Y. et al. **Healing effect of andiroba-based emulsion in cutaneous wound healing via modulation of inflammation and transforming growth factor beta 31.** *Acta Cir. Bras.*, v. 33, n. 11, p.1000-015, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30517327>>. Acesso em: 20/01/2019.

CLARK, R.A. et al. **Tissue engineering for cutaneous wounds.** *J. Investig. Dermatol.*, v. 127, p.1018-29, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19188756>>. Acesso em: 10/12/2018.

CORY, G. **Scratch-wound assay.** *Methods Mol. Biol.*, v. 769, p.25-30, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21748666>>. Acesso em: 10/10/2018.

DA SILVA, J.O. et al. **Antihemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra macroloba*.** *J. Ethnopharmacol.*, v. 22, p.145-52, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16054531>>. Acesso em: 10/01/2018.

DE VARGAS, F.S. et al. **Antioxidant activity and peroxidase inhibition of Amazonian plants extracts traditionally used as anti-inflammatory.** *BMC Complement. Altern. Med.*, v. 27, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26921197>>. Acesso em: 10/07/2018.

DELAVERY, B.M.; VAN DER VEER, W.M.; VAN EGMOND, M. **Macrophages in skin injury and repair**. *Immunobiology*, v. 216, p.753–62, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21281986> >. Acesso em: 02/02/2019.

DENG, Z.H. et al. **The effect of earthworm extract on promoting skin wound healing**. *Biosci. Rep.*, v. 38, n. 2, 2018. Disponível em : < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29531018> >. Acesso em: 07/03/2019.

DOS SANTOS COSTA, M.N.F. et al. **Characterization of Pentaclethra macroloba oil**. *J. Therm. Anal. Calorim.*, v. 115, n. 3, p.2269–2275, 2014. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s10973-012-2896-z> >. Acesso em:

EMING, S.A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. **Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation**. *Sci. Trans. Med.*, v. 6, n. 265, p. 265-269, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25473038> >. Acesso em: 26/01/2019.

FERREIRA, M.R. et al. **Development and evaluation of emulsions from Carapa guianensis (Andiroba) oil**. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, v. 11, n. 3, p.1383-90, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20824515> >. Acesso em: 26/02/2019.

GOLUBTSOVA, N.N.; FILIPPOV, F.; GUNIN, A.G. **Lamin A and lamin-associated polypeptide 2 (LAP-2) in human skin in the process of aging**. *Adv. in Gerontol.*, v. 29, n. 4, p.577-585, 2016. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1134/S2079057017010076> >. Acesso em: 10/03/2019.

GUILHERMINO, F. J. et al. **Desafios e Complexidade para Inovação a partir da Biodiversidade Brasileira**. *Rev. Pesq. Inov., Farm.* v. 4, n. 1, p.18-30, 2012. Disponível em: < <https://revista.pgsskroton.com/index.php/RPIInF/article/view/49> >. Acesso em: 29/01/2019.

GUIMARÃES, A.L. et al. **Antimicrobial Activity of Copaiba (Copaifera officinalis) and Pracaxi (Pentaclethra macroloba) Oils against Staphylococcus Aureus: Importance in Compounding for Wound Care**. *Int. J. Pharm. Compd.*, v. 20, n. 1, p.58-62, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27125055> >. Acesso em: 10/06/2019.

HAMMOND, D.C.; KIM, K. **The Short Scar Periareolar Inferior Pedicle Reduction Mammoplasty: Management of Complications**. *Clin. Plast. Surg.*, v. 43, n. 2, p.365-72, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27012795> >. Acesso em: 23/06/2019.

HAYTA, S.; POLAT, R.; SELVI, S. **Traditional uses of medicinal plants in Elazığ (Turkey)**. *J.Ethnopharmacol.*, v. 154, n. 1, p. 613–623, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27012795> >. Acesso em: 14/05/2019.

HENRIQUES, M.D.; PENIDO, C. **The therapeutic properties of *Carapa guianensis***. *Curr. Pharm. Des.*, v. 20, n. 6, p.850-6, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23701562>>. Acesso em: 05/06/2019.

HIGUCHI, K. et al. **Carapanosins A-C from Seeds of *Andiroba* (*Carapa guianensis*, Meliaceae) and Their Effects on LPS-Activated NO Production**. *Molecules*, v. 22, n. 3, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28327530>>. Acesso em: 04/04/2019.

HO, J. et al. **Current Advancements and Strategies in Tissue Engineering for Wound Healing: A Comprehensive Review**. *Adv. Wound Care (New Rochelle)*, v. 6, n. 6, p.191-209, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28616360>>. Acesso em: 05/05/2019.

JOYCE, C.W. et al. **Scar Wars: Preferences in Breast Surgery**. *Arch. Plast. Surg.*, v. 42, n. 5, p.596-600, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26430631>>. Acesso em: 05/03/2019.

KEDE, M.P.V.; SABATOVICH, O. **Dermatologia Estética**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

KITAKOSHI, T.; SHIMIZU, T. **An oligochaete homologue of the Brachyury gene is expressed transiently in the third quartette of micromeres**. *Gene Expr. Patterns.*, v. 10, p. 6, v.306-13, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20603182>>. Acesso em: 11/02/2019.

LEE, K. E. **Earthworms, their ecology and relationships with soils and land use**. Sydney: Academic Press, 1985.

LIANG, C.C.; PARK, A.Y.; GUAN, J.L. ***In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro***. *Nat. Protoc.*, v. 2, n. 2, p.329-33, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406593>>. Acesso em: 17/05/2019.

LIECHTY, K.W.; ADZICK, N.S.; Crombleholme TM. **Diminished interleukin 6 (IL-6) production during scarless human fetal wound repair**. *Cytokine*, v. 12, p.671–6, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406593>>. Acesso em: 19/05/2019.

LOURENÇO, A.R.; COFFER, P, J. **SOX4: Joining the Master Regulators of Epithelial-to-Mesenchymal Transition?** *Trends Cancer*, v. 3, n. 8, p. 571-582, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28780934>>. Acesso em: 11/01/2019.

MADDEN, J.W.; PEACOCK, E.E. **Studies on the biology of collagen during wound healing. I. Rate of collagen synthesis and deposition in cutaneous wounds of the rat**. *Surgery*, v. 64, n. 288-294, 1968. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5658731>>. Acesso em: 11/05/2019.

MAHEDIA, M.; SHAH, N.; AMIRLAK, B. **Clinical Evaluation of Hyaluronic Acid Sponge with Zinc versus Placebo for Scar Reduction after Breast Surgery.** *Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open*, v. 4, n. 7, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27536470> >. Acesso em: 16/06/2019.

MARTIN, P. **Wound healing-aiming for perfect skin regeneration.** *Science*, v. 276 p. 75–8, 1997. Disponível em: <<https://science.sciencemag.org/content/276/5309/75>>. Acesso em: 03/03/2019.

MARTINEZ, Â. A. **A grande e poderosa minhoca: manual prático do minhocultor.** 4. ed. *ampl. e rev. Jaboticabal*: Ed. Funep, 1998.

MATSUI, Y. et al. **Carapanolides J-L from the seeds of *Carapa guianensis* (Andiroba) and their effects on LPS-activated NO production.** *Molecules*, v. 19, n. 11, p.17130-40, 2014. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25347457> >. Acesso em 10/04/2019.

MATSUMOTO, C. et al. **A Limonoid, 7-Deacetoxy-7-Oxogedunin (CG-1) from Andiroba (*Carapa guianensis*, Meliaceae) Lowers the Accumulation of Intracellular Lipids in Adipocytes via Suppression of IRS-1/Akt-Mediated Glucose Uptake and a Decrease in GLUT4 Expression.** *Molecules*, v. 24, 2019. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6540142/> >. Acesso em: 12/06/2019.

MECCIA, G. et al. **Chemical composition of the essential oil from the leaves of *Carapa guianensis* collected from Venezuelan Guayana and the antimicrobial activity of the oil and crude extracts.** *Nat. Prod. Commun.*, v.8, n. 11, p.1641-2, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24427961>>. Acesso em: 15/06/2019.

MENDONÇA, A.P.; FERRAZ, I.D.K. **Óleo de andiroba: processo tradicional da extração, uso e aspectos sociais no estado do Amazonas, Brasil.** *Acta Amaz.*, v. 37, n. 3, p.353-64, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59672007000300006>. Acesso em: 02/03/2019.

MILHOMEM-PAIXÃO, S.S. et al. **The lipidome, genotoxicity, hematotoxicity and antioxidant properties of andiroba oil from the Brazilian Amazon.** *Genet. Mol. Biol.*, v. 39, n. 2, p.248-56, 2016. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572016000200248 >. Acesso em: 03/05/2019.

MISANI, M.; DE MEY, A. **Managing Complications in Vertical Mammoplasty.** *Clin. Plast. Surg.*, v. 43, n. 2, p.359-63, 2016. Disponível em: < [https://www.plasticsurgery.theclinics.com/article/S0094-1298\(15\)00201-1](https://www.plasticsurgery.theclinics.com/article/S0094-1298(15)00201-1) >. Acesso em: 05/07/2019.

MORIKAWA, T. et al. **Collagen Synthesis-Promoting Effects of Andiroba Oil and its Limonoid Constituents in Normal Human Dermal Fibroblasts.** *Oleo Sci.*, v. 67, n.10, p.1271-77, 2018. Disponível em:

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30305560>>. Acesso em: 23/04/2019.

NAMAZI, M.R.; FALLAHZADEH, M.K.; SCHWARTZ, R.A. **Strategies for prevention of scars: what can we learn from fetal skin?** *Int. J. Dermatol.*, v. 50, p. 85–93, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21039435>>. Acesso em: 12/01/2019

NAYAK, B.S. et al. **Experimental evaluation of ethanolic extract of *Carapa guianensis* L. Leaf for its wound healing activity using three wound models.** *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, 2011. Disponível em:

< <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2011/419612/>>. Acesso em: 03/02/2019.

NINOMIYA, K. et al. **Hepatoprotective Limonoids from Andiroba (*Carapa guianensis*).** *Int. J. Mol. Sci.*, v. 17, 2016. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4849045/>>. Acesso em: 18/04/2019.

OUYANG, W. S. et al. **Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease.** *Annu. Rev. Immunol.*, v. 29, p.71–109, 2011.

Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21166540>>. Acesso em: 30/03/2019.

OZEKI, H. et al. **Development and regeneration of hair cells.** *Acta Otolaryngol.*, v. 127, p.38–44, 2007. Disponível em:

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18340569>>. Acesso em: 19/03/2019.

PALMEIRA FILHO P.L.; CAPANEMA, L.X.L. **A cadeia farmacêutica nacional e o desafio da inovação: possibilidades para a atuação do BNDES e outros agentes.** In:XXX Encontro Nacional de Engenharia de Produção, ENEGEP. São Carlos, 2010. Disponível em:

< http://www.abepro.org.br/biblioteca/enegep2010_tn_sto_120_780_16189.pdf>. Acesso em: 09/02/2019.

PARK, S.Y. et al. **Wound healing potential of antibacterial microneedles loaded with green tea extracts.** *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, v. 42, p.757-62, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25063177>>. Acesso em: 27/03/2019.

PENIDO, C. et al. **Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia.** *Inflamm. Res.*, v. 54, p.295–303, 2005. Disponível em:

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16134059>>. Acesso em 01/04/2019.

PENNINGTON, T. D. **Meliaceae.** In: **Organization for Flora Neotropica.** *Fl. Neotrop. Monogr.*, v. 28, p. 407–414,1981. Disponível em:

< <http://www.scielo.br/pdf/aa/v25n3-4/1809-4392-aa-25-3-4-0193.pdf>>. Acesso em 05/04/2019.

PHAN, H.; HARGER, B.; ESTRADA, N. **Case Report: Pediatric Scar Management After Open-heart Surgery.** *Int. J. Pharm. Compd.*, v. 20, n. 4, p.277-80, 2016.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28333672>>. Acesso em: 09/05/2019.

QUAGLINO, E.L. et al. **Earthworm coelomocytes in vitro: cellular features and “granuloma” formation during cytotoxic activity against the mammalian tumor cell target K562.** *Eur. J. Cell. Biol.*, v. 70, p.278-88, 1996. Disponível em:

<<https://moh-it.pure.elsevier.com/en/publications/earthworm-coelomocytes-in-vitro-cellular-features-and-granuloma-f>>. Acesso em: 09/04/2019.

RAMOS-E-SILVA, M.; CASTRO, M.C.R. **Fundamentos de dermatologia – Edição revista e atualizada.** 2.ed.Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2010. 2369p.

ROY, A; SARAF, S.

Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 29, n. 2, v.191-201, 2006. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16462017>>. Acesso em: 09/04/2019.

SCHOLZ, C.B.; TECHNAN, U. **O papel ancestral de Brachyury: expressão de NemBra1 na cnidária basal *Nematostella vectensis* (Anthozoa).** *Dev. Genes Evol.*, v. 212, n. 12, p. 563-70, 2003. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12536320>>. Acesso em: 08/04/2019.

SEM, C.K et al. **Longaker, Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy.** *Wound Repair Regen.*, v. 17, p.763–71, 2009.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2810192/>> Acesso em 07/06/2019.

SHAH, S.R. et al. **Brachyury-YAP Regulatory Axis Drives Stemness and Growth in Cancer.** *Cell. Rep.*, v. 21, n. 2, p.495-507, 2017. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29020634>>. Acesso em: 08/04/2019.

SHESTAK, K.C.; DAVIDSON, E.H. **Assessing Risk and**

Avoiding Complications in Breast Reduction. *Clin. Plast. Surg.*, v. 43, n. 2, p.323-31, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27012790>>.

Acesso em: 09/04/2019.

SIMMONS, C.V.; BANOVA, F.; BANOVA, D. **Use of a topical anhydrous silicone base containing fatty acids from pracaxi oil in a patient with a diabetic ulcer.**

SAGE Open Med. Case Rep., 2015. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4857298/>>. Acesso em: 09/04/2019.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA ESTÉTICA. **Comuns no Brasil, cirurgias plásticas demandam precauções.** Disponível em:

<<https://exame.abril.com.br/estilo-de-vida/comuns-no-brasil-cirurgias-plasticas-demandam-precaucoes>>. Acesso em: 04/04/2019.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA PLÁSTICA (SBCP). Disponível em: <<http://www2.cirurgioplastica.org.br/sbcp/sobre>>. Acesso em: 05/05/2019.

SUNDERKOTTER, T. et al. **Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response.** *J. Immunol.*, v. 172, n. 7, p. 4410–7, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15034056>>. Disponível em: 07/01/2019.

WYNN, T.A.; VANNELLA, K.M. **Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis.** *Immunity*, v. 44, n. 3, p. 450–462, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26982353>>. Acesso em: 24/05/2019.

TAO, J. et al. **Toxic responses of Sox2 gene in the regeneration of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to Retnoic acid.** *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, v. 204, p.106-112, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29229524>>. Acesso em: 21/03/2019.

TAYLOR, D.A.H. **The Chemistry of the Limonoids from Meliaceae.** In: Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Switzerland, 1984.

TITO, A. et al. **An oil-soluble extract of *Rubus idaeus* cells enhances hydration and water homeostasis in skin cells.** *Int. J. Cosmet. Sci.*, v. 37, n. 6, p.588-94, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25940647>>. Acesso em: 17/05/2019.

TRACY, L.E.; MINASIAN, R.A.; CATERSON, E.J. **Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound.** *Adv. Wound Care.*, v. 5, p.119–136, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4779293/>>. Acesso em: 05/05/2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA (UEL). **Atlas Digital de Histologia Básica**, 2014. Disponível em: <<http://www.uel.br/ccb/histologia/portal/pages/arquivos/Atlas%20Digital%20de%20Histologia%20Basica.pdf><http://www.uel.br/ccb/histologia/portal/pages/arquivos/Atlas%20Digital%20de%20Histologia%20Basica.pdf><http://www.uel.br/ccb/histologia/portal/pages/arquivos/Atlas%20Digital%20de%20Histologia%20Basica.pdf>> Acesso em: 22/05/2019.

WAGNER, V.P. et al. **Effects of Copaiba Oil Topical Administration on Oral Wound Healing.** *Phytother. Res.*, v. 21, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28635033>>. 21/05/2019.

WANZELER, A.M.V et al. **Therapeutic effect of andiroba oil (*Carapa guianensis* Aubl.) against oral mucositis: an experimental study in golden Syrian hamsters.** *Clin. Oral Investig.*, v. 22, n. 5, p.2069-79, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29256157>>. Acesso em: 25/02/2019.

WEN, K.C. et al. **Comparison of Puerariae Radix and its hydrolysate on stimulation of hyaluronic acid production in NHEK cells.** *Am. J. Chin. Med.*, v. 38, n. 1, p.143-55, 2010. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20128051>>. Acesso em: 04/03/2019.

WERNER, S.; GROSE, R. **Regulation of wound healing by growth factors and cytokines.** *Physiol. Rev.*, v. 83, p.835–870, 2003. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12843410>>. Acesso em: 07/02/2019.

VALEMBOIS, P.; LASSÈGUES, M.; ROCH, P. **Formation of brown bodies in the coelomic cavity of the earthworm *Eisenia fetida andrei* and attendant changes in shape and adhesive capacity of constitutive cells.** *Dev. Comp. Immunol.*, v. 16, n. 2-3, p.95-101, 1992. Disponivel em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0145305X9290010A>>. Acesso em: 01/05/2019.

YANG, Y. et al. **The identification of functional proteins from amputated lumbricus *Eisenia fetida* on the wound healing process.** *Biomed. Pharmacother.*, v. 95, p.1469-1478, 2017. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28946209>>. Acesso em: 01/03/2019.

YANG, Y. et al. **The up-regulation of two identified wound healing specific proteins-HSP70 and lysozyme in regenerated *Eisenia fetida* through transcriptome analysis.** *J. Ethnopharmacol.*, v. 237, p.64-73, 2019. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30902745>>. Acesso em: 20/06/2019.

ZHENG, P. et al. **Expression of stem cell pluripotency factors during regeneration in the earthworm *Eisenia foetida*.** *Gene*, v. 575, p.58–65, 2016. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26299657>>. Acesso em: 13/04/2019.

ZIEGLER, T.R.; PIERCE, G.F.; HERNDON, D.N. **Growth Factors and Wound Healing: Basic Science and Potential Clinical Applications.** New York: Springer, 2012, 365p.